

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

ASPECTOS DO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr. EM VIDEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fábio André Hamann

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**ASPECTOS DO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Botrytis*
cinerea Pers. Ex. Fr. EM VIDEIRA**

Fábio André Hamann

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, Universidade Federal de Santa Maria/RS (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof^a. PhD. Elena Blume

Santa Maria, RS, Brasil

2011

H198a Hamann, Fábio André
Aspectos do controle biológico de *Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr. em videira /
por Fábio André Hamann. – 2011.
81 f. ; il. ; 30 cm

Orientador: Elena Blume
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de
Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, RS, 2011

1. Pós-colheita 2. BCAs 3. Biocontrole 4. Uvas I. Blume, Elena II. Título.

CDU 634.8

Ficha catalográfica elaborada por Cláudia Terezinha Branco Gallotti – CRB 10/1109
Biblioteca Central UFSM

©2011

Todos os direitos autorais reservados a Fábio André Hamann. A reprodução de partes ou do
todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação do autor.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado**

**ASPECTOS DO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea* Pers.
Ex. Fr. EM VIDEIRA**

elaborado por
Fábio André Hamann

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Elena Blume, PhD.
(Presidente/Orientador)

Fábio Rossi Cavalcanti, Dr. (EMBRAPA)

Lia Rejane Silveira Reiniger, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 15 de julho de 2011.

DEDICATÓRIA

À minha família, os grandes incentivadores da minha formação, que dedicaram muitos esforços, compreensão, incentivo e apoio incondicionais durante toda a minha vida estudantil; em especial aos meus pais e ao meu tio Lali.

Dedico e ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de uma forma ou outra a todos aqueles que contribuíram na formação deste trabalho, em especial:

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela formação adquirida e oportunidade de realização do curso de mestrado.

À CAPES pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa de mestrado.

À professora Elena pela oportunidade e orientação no meu trabalho.

À EMBRAPA Uva e Vinho e à Vinícola Miolo pela oportunidade da coleta de dados para este trabalho, em especial ao Dr. Lucas Garrido que possibilitou a coleta em Bento Gonçalves e ao Eng. Agr^o Edvard Theil Kohn em Candiota.

À professora Lia pela co-orientação deste trabalho.

Ao Dr. Fábio por aceitar a fazer parte da avaliação deste trabalho.

*Ao Dr. Jan van Kan da Universidade de Wageningen (Holanda) por prontamente esclarecer algumas dúvidas e passar importantes dicas de práticas de cultivo de *Botrytis cinerea* in vitro.*

À minha família, principalmente à minha mãe, dona Marli, por toda compreensão e força que tem me dado durante as etapas mais trabalhosas desse processo, não apenas por ser minha mãe, mas pela diferença incondicional que seu suporte e apoio me auxiliaram nesses momentos. Uma grande batalhadora acima de tudo, que apesar da sua baixa escolaridade, tem me dado as maiores lições de vida, e sou o que sou, graças a ela.

A todos os meus amigos e colegas de laboratório pela ajuda na execução dos trabalhos e principalmente pela agradável convivência.

A todos, o meu muito obrigado!!!

"Aprenda como se você fosse viver para sempre, viva como se você fosse morrer amanhã!"
(Mahatma Gandhi)

RESUMO GERAL

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

ASPECTOS DO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr. EM VIDEIRA

AUTOR: FÁBIO ANDRÉ HAMANN

ORIENTADORA: ELENA BLUME

LOCAL E DATA DA DEFESA: SANTA MARIA, 15 DE JULHO DE 2011

O Rio Grande do Sul, o estado produtor de uvas mais importante no Brasil, colhe em média 780 mil toneladas por ano. Um dos maiores entraves para a obtenção de maiores médias de produção é a incidência de doenças de final de ciclo (DFC), sendo *Botrytis cinerea*, agente causador da podridão-cinzenta, um dos maiores responsáveis por perdas de produção no campo e na pós-colheita. Uvas tintas podem apresentar maior resistência à podridão-cinzenta, devido à maior concentração de compostos fenólicos. O uso de agentes de controle biológico (BCAs) é uma alternativa promissora no controle da podridão de botrytis. Dessa maneira, os objetivos deste estudo foram testar isolados do patógeno coletados das duas principais regiões vitivinícolas do RS em confronto direto *in vitro* com isolados de agentes antagonistas (*Trichoderma* spp e *Gliocladium* sp.) e testar os mesmos isolados do patógeno em controle biológico semi *in vivo* com os isolados antagonistas que obtiveram as maiores médias de atividade de biocontrole no teste *in vitro*, na pós-colheita de uvas de mesa, em cultivares branca e tinta. Os isolados de *B. cinerea* empregados foram UFSM SG01, UFSM SG02, UFSM SG 03, oriundos da serra, e UFSM CM01 e UFSM CM02, oriundos da campanha meridional. Os isolados antagonistas empregados no teste *in vitro* foram UFSM T20, UFSM T17, UFSM T15.1 (oriundos de solo), UFSM TSG, UFSM TCM (oriundos de cachos de uva coletados nas mesmas regiões de coleta do patógeno), de *Trichoderma* spp., e UFSM G4DB, de *Gliocladium* sp.. Os isolados UFSM TSG, UFSM TCM e UFSM T15.1 foram os três que obtiveram as maiores médias de atividade de biocontrole, em geral acima de 50%, para todos os isolados de *B. cinerea*, testados em confronto direto *in vitro*. Esses isolados BCAs foram selecionados para o teste de controle biológico semi *in vivo* em bagas destacadas, em três períodos de inoculação: *B+T*, antagonista e patógeno aplicados ao mesmo tempo; *B+24hT*, patógeno inoculado primeiro e antagonista 24h após, *T+24hB*, antagonista aplicado primeiro e patógeno 24h após. O maior controle, assumido a partir do menor grau de dano, no período *T+24hB*, evidenciou a importância do tratamento preventivo. Rachaduras em bagas tiveram maior influência do que a coloração da casca na ocorrência da podridão-cinzenta.

Palavras-chave: Pós-colheita. BCAs. Biocontrole. Uvas.

GENERAL ABSTRACT

Master of Science Dissertation
Post-Graduation in Agronomy Programme
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ASPECTS OF *Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr. BIOLOGICAL CONTROL ON GRAPEVINE

AUTHOR: FÁBIO ANDRÉ HAMANN

ADVISOR: ELENA BLUME

LOCATION AND DATE OF PRESENTATION: SANTA MARIA, JULY 15th 2011.

Rio Grande do Sul (RS), the most important state of grape production in Brazil, harvests, approximately, 780 thousand tons annually. One of the biggest constraint factors to the obtainment of higher production numbers is the incidence of late season diseases in vineyards, being botrytis bunch rot, caused by *Botrytis cinerea*, one of the major contributors for field and post-harvest losses. Red grapes can show more resistance against this fungus, due to higher levels of phenolic compounds. The use of biological control agents (*BCAs*) emerges as a promising alternative to control botrytis disease. For this reason, the objectives of this study were to test isolates from this fungal pathogen, originated from the two main grape production regions in the state of RS, through *in vitro* direct confront test against *BCAs* fungal isolates (*Trichoderma* spp. and *Gliocladium* sp.) and to test the same pathogen isolates on semi *in vivo* biological control, against the *BCAs* isolates which obtained the highest biological activity during the *in vitro* test, on the post-harvest storage of table grapes, on a red and a white cultivar. The *B. cinerea* isolates used were UFSM SG01, UFSM SG02, from 'serra' (*mountain range*) region, UFSM CM01, and UFSM CM02, from 'campanha meridional' (*meridional pampas*) region. The *BCAs* isolates used in this study were *Trichoderma* spp., UFSM T20, UFSM T17, UFSM T15.1 (obtained from soil), UFSM TSG, UFSM TCM (obtained from the same grape bunches where *B. cinerea* was isolated, representing each region), and *Gliocladium* sp., UFSM G4DB (obtained from soil). UFSM TSG, UFSM TCM and UFSM T15.1 showed the highest biocontrol activity (B. A.) *in vitro*, in general over 50% against all *B. cinerea* isolates. The same *BCAs* were selected to be used at the semi *in vivo* test with detached berries for three inoculation periods: *B+T*, pathogen and *BCA* inoculated at the same time; *B+24hT*, pathogen inoculated first and *BCA* 24 h later, *T+24hB*, *BCA* inoculated first and pathogen 24 h later. A higher control, considered as the lower damage level, on *T+24hB* period, showed the importance of preventive treatment. Cracks on berries played a more important role than the color of the skin for botrytis infection.

Keywords: Post-harvest. *BCAs*. Biocontrol. Grapes.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Vista aérea de duas áreas de vinhedos do Rio Grande do Sul, nos municípios de Candiota, 31°23'S, 53°46'O, 262 m (a) e Bento Gonçalves, 29°09'S, 51°37'O, 533 m (b). Altitude do ponto de visão 1,26 Km..... 16
- FIGURA 2 – Parasitismo micelial exercido por *Pythium radiosum* sobre *Botrytis cinerea*. A) Hifa normal de *B. cinerea*. B) Hifa de *P. radiosum* (parasita) dentro do micélio de *B. cinerea* (hospedeiro). C) Protoplasma coagulado na hifa do hospedeiro. D) Proliferação e saída da hifa do parasita de dentro da hifa do hospedeiro. E) Hifa vazia de *B. cinerea*. F) Hifa de *B. cinerea* totalmente destruída com estruturas sexuais de *P. radiosum*. Escala de aumento: A-C, E, F = 35 µm; D = 100 µm 21
- FIGURA 3 – Passos envolvidos na fabricação de um produto biocontrolador 24
- FIGURA 4 – Dois exemplos de mecanismos envolvidos no antagonismo exercido por *Trichoderma*: a) micoparasitismo: o micélio de *Trichoderma* penetra e invade o micélio do patógeno promovendo a sua degradação, b) competição: *Trichoderma* e patógeno competem juntos pelo mesmo espaço e por nutrientes do meio 26
- FIGURA 5 – Coleta de material fúngico para a obtenção dos isolados de *B. cinerea*. 1) escolha do parreiral; 2) estabelecimento das coordenadas geográficas e numeração de linhas e plantas; 3) identificação de plantas com cachos infectados por *B. cinerea*; 4) coleta das bagas com sintomas. Candiota, RS, 2010..... 30
- FIGURA 6 – Identificação do material coletado, segundo cultivar, planta, linha, cacho e município. Santa Maria, RS, 2010 30
- FIGURA 7 – A) Medição do crescimento de uma colônia fúngica utilizando paquímetro digital; B) detalhe dos dois sentidos perpendiculares. Santa Maria, RS, 2009..... 34
- FIGURA 8 – Câmara de Neubauer em microscópio ótico para contagem de conídios. Santa Maria, RS, 2010..... 34
- FIGURA 9 – Crescimento micelial atingido ao final do sétimo dia de incubação do confronto direto, isolados UFSM CM 02 x UFSM T20. Santa Maria, RS, 2010 36
- FIGURA 10 – Ciclo da podridão-cinzenta da uva no vinhedo. Em destaque: produção de esporos - fonte de inóculo - durante o ciclo da doença. 40

- FIGURA 11 – Confronto direto de UFSM SG02 x UFSM G4DB. *B. cinerea* cresce por toda a placa não sendo afetado pelo crescimento de *Gliocladium* sp.. Santa Maria, RS, 2010.....45
- FIGURA 12 – Atividade de Biocontrole (%) *in vitro* de isolados de *Trichoderma* sp.em confronto direto com *Botrytis cinerea*. (A) UFSM TFS, (B) UFSM TSG e (C) UFSM T15.1 (C). Santa Maria, RS, 201046
- FIGURA 13 – Possíveis interações entre hospedeiro, patógeno e antagonista. Pontos de interrogação indicam aquelas que ainda estão em estudo57
- FIGURA 14 – Exemplificação do material fúngico, a) isolados de *Botrytis cinerea* e b) isolados de *Trichoderma* sp., e do material vegetal, c) bagas de uvas (na foto – tintas), empregados no estudo. Santa Maria, RS, 201161
- FIGURA 15 – Aparecimento de micélio de *Trichoderma* (coloração verde) na lesão, em meio ao micélio de *B. cinerea* (coloração cinza), em bagas de uva com rachaduras, cultivar 'Niágara Branca'. Nesse entrelaçamento de micélios, possivelmente, está sendo exercida a ação parasitária do antagonista sobre o patógeno. Santa Maria, RS, 201165
- FIGURA 16 – Relação entre rachaduras e sintomas em bagas. a) Uvas tintas com rachaduras em maior quantidade, com expressão das notas 2 (rachaduras) e 5 (rachaduras e sintomas). b) Uvas brancas com rachaduras em menor quantidade e c) expressão da nota 4 nas mesmas. Santa Maria, RS, 201176

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------|--|----|
| TABELA 1 – | Código dos isolados de <i>B. cinerea</i> com a descrição da cultivar de <i>Vitis vinifera</i> , área, numerações da linha, planta e cacho e localização dos vinhedos de coleta. Santa Maria, RS, 2011 | 31 |
| TABELA 2 – | Código dos isolados de antagonistas com a descrição da origem segundo parte do sistema solo-planta e da espécie agrícola. Santa Maria, RS, 2011 | 33 |
| TABELA 3 – | Crescimento micelial (cm) <i>in vitro</i> de isolados de <i>B. cinerea</i> oriundos de vinhedos da serra gaúcha e da campanha meridional. Santa Maria, RS, 2011 | 38 |
| TABELA 4 – | Esporulação dos isolados de <i>B. cinerea</i> (10^6 conídios.mL ⁻¹) após cinco dias de incubação em placas de Petri com meio BDA. Santa Maria, RS, 2011 | 39 |
| TABELA 5 – | Crescimento micelial (cm) dos isolados antagonistas de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Gliocladium</i> sp. 5 dias após a incubação em placas de Petri em meio BDA. Santa Maria, RS, 2011..... | 42 |
| TABELA 6 – | Esporulação (conídios.mL ⁻¹) dos isolados antagonistas (BCAs) (<i>Trichoderma</i> spp. e <i>Gliocladium</i> sp.) 5 dias após a incubação em placas de Petri com meio BDA. Santa Maria, RS, 2011..... | 42 |
| TABELA 7 – | Atividade de Biocontrole (A.B.) (%) dos isolados BCAs sobre os isolados de <i>B. cinerea</i> em confronto direto em meio de cultura BDA. Avaliação aos 5 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2011 | 44 |
| TABELA 8 – | Médias de grau de dano (G. D.) (%) na expressão da nota 2 (bagas rachadas) em uvas de mesa brancas e tintas, cultivares ‘Niágara Branca’ e ‘Niágara Rosada’, respectivamente, inoculadas com isolados do patógeno <i>B. cinerea</i> e do antagonista <i>Trichoderma</i> no período de inoculação B+T (inoculação simultânea de patógeno e antagonista). Santa Maria, RS, 2011 | 67 |
| TABELA 09 – | Médias de grau de dano (%) na expressão da nota 5 (bagas rachadas e com sintomas de <i>B. cinerea</i>) em uvas de mesa brancas e tintas, cultivares ‘Niágara Branca’ e ‘Niágara Rosada’, respectivamente, inoculadas com isolados do patógeno <i>B. cinerea</i> e do antagonista <i>Trichoderma</i> no período de inoculação B+T (inoculação simultânea de patógeno e antagonista). Santa Maria, RS, 2011 | 68 |

- TABELA 10 – Médias de grau de dano (%) na expressão da nota 5 (bagas rachadas e com sintomas de *B. cinerea*) em uvas de mesa brancas e tintas, cultivares ‘Niágara Branca’ e ‘Niágara Rosada’, respectivamente, inoculadas com isolados do patógeno *B. cinerea* e do antagonista *Trichoderma* no período T+24hB (inoculação do antagonista 24 horas anteriores à inoculação do patógeno). Santa Maria, RS, 201171
- TABELA 11 – Médias (%) de danos classificados como nota 3 (escurecimento e rachaduras) em bagas de uvas de mesa tintas e brancas (Niágara Branca e Niágara Rosada) inoculadas com isolados do patógeno *B. cinerea* e do antagonista *Trichoderma* no período de inoculação B+T. Santa Maria, RS, 201174
- TABELA 12 – Grau de dano (G.D.) (%), causado por isolados de *Botrytis cinerea* em antagonismo com isolados de *Trichoderma* sp., classificados como nota 5 (bagas com sintomas e rachaduras) e nota 4 (bagas com sintomas) em três períodos de inoculação (P.I.) sobre bagas de uva de mesa brancas e tintas, cultivares ‘Niágara Branca’ e ‘Niágara Rosada’, respectivamente. Santa Maria, RS, 2011.....75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------|--|
| A. B. | – atividade de biocontrole |
| ANOVA | – análise de variância |
| B | – <i>Botrytis cinerea</i> |
| B + T | – <i>Botrytis cinerea</i> mais <i>Trichoderma</i> |
| B + 24hT | – <i>Trichoderma</i> vinte quatro horas após <i>Botrytis cinerea</i> |
| BCA | – <i>biological control agent</i> – agente de controle biológico |
| BDA | – batata dextrose ágar |
| BOD | – <i>biological oxygen demand</i> – demanda biológica de oxigênio |
| CM | – campanha meridional |
| DB | – doente cultivar B (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) |
| G | – <i>Gliocladium</i> |
| P.I. | – períodos de inoculação |
| SANEST | – sistema de análise estatística para microcomputadores |
| SG | – serra gaúcha |
| SISVAR | – sistema de análise de variância para dados balanceados |
| T | – <i>Trichoderma</i> |
| T + 24hB | – <i>Botrytis cinerea</i> vinte e quatro horas após <i>Trichoderma</i> |
| UFMS | – Universidade Federal de Santa Maria |
| UFMS CM01 | – isolado número 1 de <i>B. cinerea</i> coletado na campanha meridional |
| UFMS CM02 | – isolado número 2 de <i>B. cinerea</i> coletado na campanha meridional |
| UFMS G4DB | – isolado de <i>Gliocladium</i> da micoteca do Laboratório Elocy Minussi, oriundo de rizosfera de planta doente (D) de soja, cultivar Fundacep (B) |
| UFMS SG01 | – isolado número 1 de <i>B. cinerea</i> coletado na serra gaúcha |
| UFMS SG02 | – isolado número 2 de <i>B. cinerea</i> coletado na serra gaúcha |
| UFMS SG03 | – isolado número 3 de <i>B. cinerea</i> coletado na serra gaúcha |
| UFMS TCM | – isolado de <i>Trichoderma</i> coletado na campanha meridional |
| UFMS TSG | – isolado de <i>Trichoderma</i> coletado na serra gaúcha |
| UFMS T20 | – isolado de <i>Trichoderma</i> número 20 da micoteca do Laboratório Elocy Minussi |

- UFSM T17 – isolado de *Trichoderma* número 17 da micoteca do Laboratório Elocy Minussi
- UFSM T15.1 – isolado de *Trichoderma* número 17 da micoteca do Laboratório Elocy Minussi.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO | 15 |
| ANTAGONISMO <i>in vitro</i> ENTRE ISOLADOS DE <i>Botrytis cinerea</i> E ISOLADOS DE FUNGOS BIOCONTROLADORES | 20 |
| 1.1 Introdução | 20 |
| 1.2 Material e métodos | 28 |
| 1.2.1 Coleta do material fúngico e obtenção dos isolados | 28 |
| 1.2.2 Local..... | 32 |
| 1.2.3 Crescimento micelial e esporulação de <i>Botrytis cinerea</i> e dos antagonistas <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Gliocladium</i> sp. | 32 |
| 1.2.4 Pareamento de culturas | 34 |
| 1.2.4.1 Estimativa da atividade de biocontrole | 35 |
| 1.2.5 Procedimento estatístico | 36 |
| 1.3 Resultados e discussão | 37 |
| 1.3.1 Crescimento micelial e esporulação de <i>Botrytis cinerea</i> e dos antagonistas <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Gliocladium</i> sp. | 37 |
| 1.3.2 Pareamento de culturas | 43 |
| 1.4 Comentários finais | 46 |
| 1.5 Referências | 47 |
| CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Botrytis cinerea</i> COM <i>Trichoderma</i> spp. NA PÓS-COLHEITA DE UVAS DE MESA | 55 |
| 2.1 Introdução | 55 |
| 2.2 Material e Métodos | 60 |
| 2.2.1 Material fúngico e vegetal..... | 60 |
| 2.2.2 Local..... | 62 |
| 2.2.3 Instalação do experimento | 62 |
| 2.2.4 Análise dos dados | 63 |
| 2.3 Resultados e discussão | 64 |
| 2.4 Comentários finais | 76 |
| 2.5 Referências | 77 |

INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de uvas concentra-se nas regiões sul, sudeste e nordeste, colhendo uma média anual de 1,4 milhões de toneladas (IBGE, 2009). Constitui-se em atividade consolidada com importância socioeconômica nos estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Paraná, Santa Catarina, São Paulo e, principalmente, Rio Grande do Sul. Este colhe em média 780 mil toneladas por ano, sobretudo de safras vindas da região da serra gaúcha, o principal pólo vitivinícola do Estado (IBGE, 2009). A cultura da videira foi introduzida nessa região há mais de um século pelas primeiras famílias colonizadoras italianas que ali se estabeleceram. Outra região que vem recebendo grandes investimentos, especialmente no setor vinícola, é a região da campanha meridional – no *pampa rio-grandense* – a qual, devido ao clima favorável, surge como uma promessa na produção de vinhos finos de qualidade destinados à comercialização internacional.

Bento Gonçalves, na serra gaúcha, é o maior produtor de uvas do Rio Grande do Sul (RS); em média, colhe 100 mil toneladas por ano (IBGE, 2009). O município situa-se nas coordenadas 29°09'S e 51°31'W, a 640 m acima do nível do mar, com clima do tipo temperado quente (Cfb), segundo a classificação de Köppen. Apresenta regime de chuvas isoigro, com uma média anual acumulada de 1736 mm, o que resulta em certas restrições na produção sob o ponto de vista fitossanitário. Na campanha meridional, a maior parte dos vinhedos vem sendo instalada no município de Candiota, a 45 km de Bagé, os quais, em 2008, produziram 550 toneladas (IBGE, 2009). Candiota situa-se nos paralelos 31°28'S e 53°40'W, a 230 m acima do nível do mar, com clima do tipo subtropical (Cfa), segundo a classificação de Köppen. As precipitações costumam ser regularmente distribuídas durante o ano, com um volume médio anual de 1472 mm, viabilizando, portanto, a produção de vinhos, devido aos períodos de estiagem nos meses que coincidem com a maturação da uva. A figura 1 destaca dois exemplos de áreas de produção de uvas dessas duas importantes regiões vitícolas do estado do RS.



Figura 1 – Vista aérea de duas áreas de vinhedos do Rio Grande do Sul, nos municípios de Candiota, 31°23'S, 53°46'O, 262 m (a) e Bento Gonçalves, 29°09'S, 51°37'O, 533 m (b). Altitude do ponto de visão 1,26 km

Fonte: Google Earth, 2011

No entanto, um dos maiores entraves para a obtenção de maiores safras no RS, assim como também em todas as áreas vitícolas do mundo, é a incidência de doenças de final de ciclo, as denominadas DFC, que geralmente culminam na redução da qualidade final do produto, este tanto sendo uvas destinadas à fabricação de vinhos, sucos e espumantes, quanto uvas de mesa destinadas ao consumo *in natura*. As DFC são representadas principalmente pelas podridões de cacho, sendo as mais importantes a podridão-amarga, a podridão-da-uva-madura, a podridão-ácida e a podridão-cinzenta-da-uva ou o botritis como também é popularmente conhecida, cuja terminologia faz referência ao seu agente causador, o fungo filamentosso *Botrytis cinerea* (SÔNEGO et al., 2003).

Os prejuízos causados por *B.cinerea* geralmente contribuem para grandes impactos na produção de uvas. No RS, ainda não se tem nenhum dado concreto do prejuízo econômico causado pela doença, mas em anos muito chuvosos já tem sido constatada a presença do patógeno nos vinhedos em períodos antecedentes à maturação, por exemplo, na pré-floração e na floração (SÔNEGO et al., 2003).

As perdas podem ser significativas em todas as variedades, americanas, viníferas ou híbridas, contudo a doença mostra-se mais agressiva em cultivares de cachos compactos, sobretudo em viníferas, por abrangerem o maior número de cultivares com essa característica morfológica. A compactabilidade dos cachos é um

fator importante para a doença, pois ela é responsável pelo favorecimento de um microclima adequado para a colonização do patógeno, com umidade excessiva e dificuldade para a penetração de produto de controle. Outro fator que explica diferenças na suscetibilidade entre variedades e cultivares é a cor da baga; cultivares de uvas tintas contêm compostos que inibem em parte o fungo, sendo menos atacadas que as brancas. A espessura da película também é um fator determinante na suscetibilidade da cultivar (SÔNEGO et al., 2003).

A doença incide numa ampla faixa de temperatura e elevado teor de umidade. Na maioria dos casos, podridões severas estão associadas com umidade relativa alta e temperaturas entre 15 e 28 °C, durante a maturação da uva. Essas condições ocorrem no RS, tornando difícil o controle da doença. Por sua vez, em locais de baixa umidade esse fungo é responsável pelo fenômeno da podridão-nobre. Quando a infecção acontece no final da maturação da uva em condições favoráveis, ocorre o amolecimento da casca e há uma perda de água, impedindo que os frutos se deteriorem; as bagas murçam e tornam-se extremamente ricas em açúcar (30 a 40%), usadas para elaborar vinhos e altamente aromáticos em alguns lugares no mundo, como na Europa. No RS, o resultado da infecção por *B. cinerea* é geralmente uma podridão prejudicial, devido às condições climáticas de alta umidade.

Com relação à etiologia, o fungo é conhecido na fase perfeita como *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (sinonímia *Sclerotinia fuckeliana* (de Bary) Fuckel); enquanto que *Botrytis cinerea* é a denominação dada à fase imperfeita ou conidial. Dessa forma, o teleomorfo (fase perfeita) *B. fuckeliana* pertence ao filo Ascomycota, um discomiceto pertencente aos ascomicetos filamentosos da família Sclerotinaceae, dentro da ordem Helotiales. Os conídios do anamorfo (fase imperfeita) são ovóides ou globosos, lisos de cor cinza, medindo de 10 a 12 x 8 a 10 µm. Em condições adversas pode produzir escleródios escuros, em forma de disco, medindo de 2 a 4 x 1 a 3 mm fortemente aderido ao substrato. O teleomorfo é raramente encontrado no vinhedo, produz apotécio de 1 a 5 mm de comprimento, os ascósporos são hialinos, unicelulares, ovóides ou elipsóides medindo 7 x 5,5 µm (BEEVER; WEEDS, 2007; SÔNEGO et al., 2003). O nome dos fungos, muitas vezes dá uma ideia geral do que podemos encontrar com relação a sua morfologia. Assim, *Botrytis* originalmente refere-se à figura de um cacho, pois os conidióforos e conídios do fungo estão arranjados de tal maneira que lembra um cacho de uva, enquanto

que *cinerea* significa cinzento, ou seja, a coloração dessas estruturas. Portanto, *B. cinerea* é um fungo que causa uma enfermidade, cujos sintomas e, principalmente os sinais, são de cor acinzentada. É um fungo polífago de distribuição mundial. Entre os 235 hospedeiros relatados, encontram-se hortaliças e frutíferas, tais como macieira (*Malus domestica* Borkh.), pereira (*Pyrus* L.), ameixeira (*Prunus* L.), pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch), morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch), quivizeiro (*Actinidia deliciosa* A. Chevallier (C. F. Lang et A. R. Ferguson)) e videira. (*Vitis* L.). Esse fungo pode agir como patógeno e também sobreviver saprofiticamente em tecidos mortos, senescentes ou necróticos, ou seja, ele é um fungo hemibiotrófico.

Na videira, os sintomas são principalmente observados nos cachos. Nas folhas os sintomas ocorrem na forma de lesões marrom-escuras, mas são pouco frequentes em condições de campo. Os primeiros sintomas ocorrem na primavera e são microscópicos. Na floração, o estilete floral é infectado, o fungo invade a baga, permanecendo latente durante o desenvolvimento da mesma, só aparecendo os sintomas no início da maturação. A podridão no cacho toma início com uma simples baga, a qual fica de coloração amarronzada e apodrece, produzindo massa de esporos visíveis. Quando a película da baga racha, o mosto da uva escorre sobre o cacho produzindo a característica aparência de podridão cinzenta, em virtude da esporulação do fungo. Se o ataque ocorrer pelo pedúnculo ou pedicelo, forma-se a podridão peduncular, responsável pela queda prematura dos cachos ou parte deles. A esporulação é mais intensa em condições de alta umidade. Até mesmo em estacas vegetativas armazenadas poderá ocorrer o ataque do fungo, produzindo um micélio esbranquiçado com aspecto de teia-de-aranha, podendo também ocorrer a formação de escleródios escuros na superfície dos ramos.

Na pós-colheita de uvas, o fungo pode incidir diretamente sobre os cachos durante o transporte e armazenamento ou pode causar danos por meio de inóculo latente oriundo de infecções nos vinhedos durante a maturação ou pré-maturação dos cachos. As perdas por *B. cinerea* nessa etapa de produção são bastante significativas, muitas vezes aumentando o valor do produto até chegar à mesa do consumidor. Em países em desenvolvimento, as perdas são estimadas em 50% ou mais, incluindo também podridões causadas por outros agentes patogênicos, mas, contudo, prevalecendo a podridão-cinzenta.

A principal forma de controle da doença, ainda é o controle químico, mas por razões de aumento da resistência do patógeno a vários ingredientes ativos e ao aumento da consciência ambiental, assim como, o aumento das exigências de consumidores a produtos vegetais manejados de forma mais ecológica, o controle biológico, principalmente através do uso de microrganismos antagonistas, vem recebendo maiores atenções e investimentos, surgindo como uma alternativa mais limpa para o controle de podridões, como a podridão-cinzenta, em uvas no campo e na pós-colheita.

Nesse sentido, em se tratando do patossistema "*Vitis* sp. x *Botrytis cinerea*" e do controle biológico desse patógeno, os principais objetivos deste trabalho foram testar isolados de *Botrytis cinerea* coletados de vinhedos de uvas viníferas das duas principais regiões produtoras do Rio Grande do Sul (serra e campanha meridional) em confronto direto *in vitro* com isolados de fungos antagonistas, assim como, selecionar os isolados antagonistas que obtiveram os melhores resultados de atividade de biocontrole *in vitro* para testes de controle biológico semi *in vivo* de *B. cinerea* incidente na pós-colheita de uvas de mesa.

Para a melhor compreensão, este trabalho foi dividido em duas partes. Na primeira, realizou-se o ensaio de confronto direto *in vitro* e na segunda o ensaio de controle biológico semi *in vivo*.

ANTAGONISMO *in vitro* ENTRE ISOLADOS DE *Botrytis cinerea* E ISOLADOS DE FUNGOS BIOCONTROLADORES

1.1 Introdução

Na Fitopatologia o termo *antagonismo* é empregado para designar a ação de um microrganismo sobre o crescimento e o metabolismo de outro; ou seja, é a ação do agente antagonista, biocontrolador, agente de controle biológico (*BCA* – *Biological Control Agent*) ou, simplesmente, *antagonista*, sobre o crescimento e o metabolismo do agente patogênico ou, comumente denominado, *patógeno* ou *fitopatógeno*, sugerindo-se a existência de vários modos de ação do primeiro para controlar o segundo durante a infecção no tecido vegetal. A relação antagônica pode ocorrer por diferentes mecanismos, sendo esses: competição, parasitismo e/ou antibiose; assim como também, o biocontrolador pode induzir mecanismos de defesa na planta hospedeira durante a infecção e a colonização do patógeno (BARKAI-GOLAN, 2001; BETTIOL; GHINI, 1995).

Na competição, espaço e nutrientes ofertados pelo meio são os principais elementos-alvo pelos quais os dois microrganismos competem; já no parasitismo (Figura 2), o antagonista lança mão de atributos físicos para conter o avanço do patógeno, através do crescimento do seu micélio sobre-, ou do entrelaçamento do mesmo com o micélio do patógeno, ou também, através de atributos metabólicos como a secreção de enzimas e compostos antibióticos, neste caso, contudo, faz-se referência também à antibiose; e, finalmente, em se tratando da indução de mecanismos de defesa no hospedeiro, *BCAs* podem estimular, entre a ativação de vários outros mecanismos de defesa na planta, a produção de fitohormônios na mesma, como, por exemplo, o etileno, um gás orgânico responsável pela cicatrização de ferimentos e senescência de tecidos lesionados (BENHAMOU; CHET, 1996; BÉLAGER et al., 1995). Na prática, provavelmente são poucos os microrganismos que exerçam um único mecanismo de antagonismo. Um antagonista pode atuar por meio de um ou mais mecanismos. Isso constitui uma característica muito desejável, pois as chances de sucesso no controle de doenças serão aumentadas. Além disso, os mecanismos não são mutuamente exclusivos ou

excludentes, pois sua relativa importância pode variar com as condições do ambiente e o estado de desenvolvimento do *BCA* e do fitopatógeno (MELO, 1998). Assim sendo, o conhecimento dos mecanismos do antagonismo é essencial para o desenvolvimento de modelos racionais para a introdução de biocontroladores em sistemas de produção vegetal.

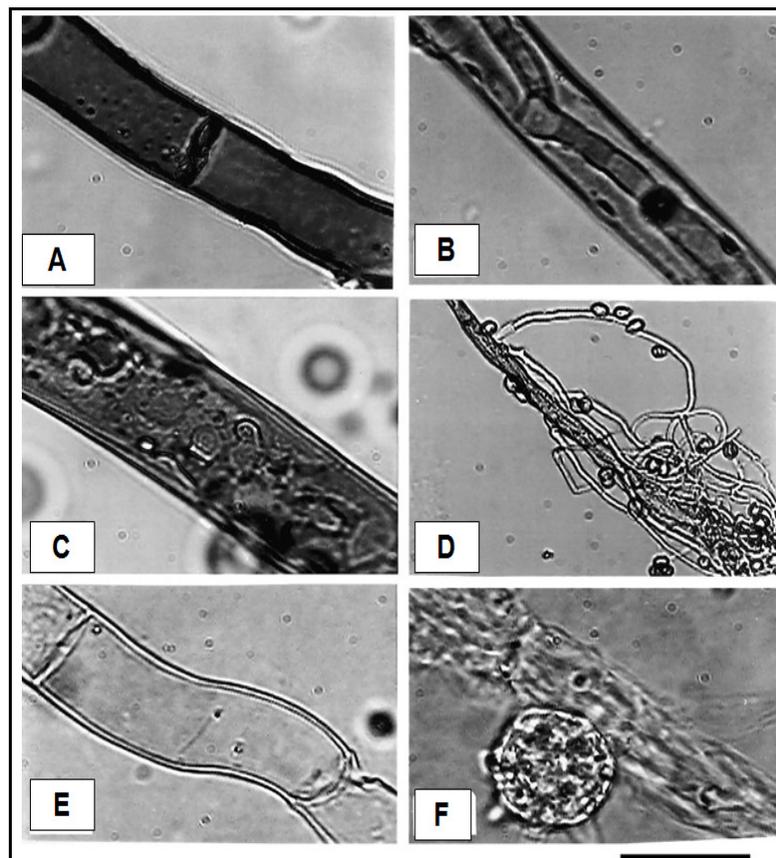


Figura 2 – Parasitismo micelial exercido por *Pythium radiosum* sobre *Botrytis cinerea*. A) Hifa normal de *B. cinerea*. B) Hifa de *P. radiosum* (parasita) dentro do micélio de *B. cinerea* (hospedeiro). C) Protoplasma coagulado na hifa do hospedeiro. D) Proliferação e saída da hifa do parasita de dentro da hifa do hospedeiro. E) Hifa vazia de *B. cinerea*. F) Hifa de *B. cinerea* totalmente destruída com estruturas sexuais de *P. radiosum*. Escala de aumento: A-C, E, F = 35 μm ; D = 100 μm .
Fonte: Paul, 1999.

Fitopatógenos e *BCAs* são representados principalmente por espécies que integram os reinos Fungi e Monera. Há também grande ocorrência de vírus, fitoplasmas e nematóides, sendo patógenos em sua maioria absoluta, não existindo,

ainda, estudos que comprovem algum benefício desses agentes no controle de doenças em plantas. Fungos e bactérias, por outro lado, exercem funções fitopatogênicas e ao mesmo tempo podem ser empregados no controle biológico de algumas doenças em plantas. Sanford (1926) publicou um trabalho sobre fatores que afetavam a patogenicidade de *Streptomyces scabies* (Thaxt.) Waks. & Henrici agente causal da sarna comum da batata. Alguns anos depois, Sanford e Broadfoot (1931) empregaram pela primeira vez o termo *controle biológico*, em um artigo sobre o mal-do-pé do trigo, causado por *Gaeumannomyces graminis var. tritici* (Sacc.) Arx & Oliv. Uma das primeiras observações do controle biológico de *Botrytis* foi feita por Newhook (1951) e Wood (1951) que inocularam espécies fúngicas de ocorrência comum, como *Fusarium* spp. e *Penicillium claviforme* Bainier, em folhas senescentes de alface, constatando-se mais tarde que a podridão-cinzenta causada por *B. cinerea* nessa espécie folhosa havia sido controlada ou estabilizada; os autores passaram a acreditar então, o que anos depois viria a se confirmar (NEWHOOK, 1957), que a atividade saprofítica de espécies fúngicas era a principal responsável pelo controle da podridão nesse patossistema sob condições naturais. *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link também foi citado como um bom controlador de podridão-cinzenta em morangueiro por prevenir o ataque do fungo já durante o período de floração (BHATT; VAUGHAN, 1962). Desde a década de 70, o gênero *Trichoderma* passou a ser amplamente empregado no controle de *B. cinerea* em feijão (NELSON; POWELSON, 1988), uva (GUILLINO, 1991; DUBOS, 1992; O'NEILL et al., 1997), morango (TRONSMO; DENNIS, 1977) e hortaliças produzidas em estufa (ELAD; SHTIENBERG, 1995) Anos mais tarde, *Gliocladium* sp. também começou a ser investigado com o intuito de testar o seu potencial de supressão sobre *B. cinerea*, realizando-se estudos de controle biológico da podridão-cinzenta em roseiras com alguns isolados dessa espécie antagonista (TATAGIBA et al., 1998; MORANDI et al., 2003). Com relação ao emprego de bactérias controladoras, Elad et al (1994) destacaram o uso de *Bacillus* e *Pseudomonas* como antagonistas de *B. cinerea* em feijoeiro e tomateiro. De modo geral, microrganismos com potencial biocontrolador são avaliados previamente *in vitro* com o intuito de maximizar seus efeitos sobre patógenos e posteriormente testá-los sobre populações fitopatogênicas no campo ou em outras etapas da produção vegetal, como por exemplo, na pós-colheita, por meio de produtos biológicos formulados a partir de células e estruturas dos agentes de controle biológico (VERMA et al., 2007; PAL; GARDENER, 2006).

Para que o produto biológico seja formulado e lançado no mercado, alguns critérios precisam ser levados em consideração para assegurar a efetividade dos BCAs. No entanto, a determinação das características necessárias para o emprego do agente é o primeiro passo para a seleção de um antagonista em potencial. Wilson e Wisniewski (1989) listaram as características necessárias de um agente biocontrolador, as quais são: (1) estabilidade genética; (2) efetividade em baixas concentrações de produto; (3) simples exigência nutritiva; (4) capacidade de sobrevivência em condições ambientais adversas; (5) grande eficiência de controle para um amplo espectro de espécies fitopatogênicas; (6) resistência a defensivos químicos; (7) não-produtores de metabólitos ou toxinas danosas à saúde humana; e (8) não-patogênico ao hospedeiro. Além desses critérios, o fácil manuseio sem ofertas de riscos ao aplicador também deve ser considerado.

A Figura 3 esquematiza as etapas envolvidas na formulação de produtos de biocontrole desde o isolamento de culturas antagonistas até o registro da marca do produto. Para o registro e o lançamento de novas formulações, bioensaios *in vitro* e *in vivo* precisam ser previamente realizados. Os ensaios *in vitro* devem ser realizados com a finalidade de se obter uma pré-definição do antagonista, assim como verificar suas habilidades de controle, realiza-se, para isso, o teste de confronto direto das colônias antagonistas com as colônias patogênicas. O teste de confronto direto é caracterizado pelo crescimento micelial de ambos os agentes que, normalmente, são colocados em extremidades opostas em placas de Petri vertidas com meio de cultura para crescimento. Realiza-se a mensuração periódica ou uma mensuração final do crescimento dos micélios opostos, atribuindo-se uma nota ou calculando-se a área de crescimento das colônias, em que se avalia a sobreposição de crescimento do antagonista sobre a colônia de patógenos.

Scher e Castagno (1986) relataram em seu trabalho várias publicações sobre a eficiência de agentes biológicos, porém, em contrapartida, ressaltando a deficiência da oferta de produtos do segmento no mercado. O fato foi remetido ao *status* ao qual a pesquisa sobre controle biológico com emprego de microrganismos antagonistas se encontrava naquele momento, ou seja, ela ainda estava emergindo, se restringindo ao estudo em laboratório, sem se ter maiores perspectivas industriais. Ao longo dos anos, esse cenário tem mudado, e atualmente já é possível encontrar no comércio vários produtos formulados a partir de células de biocontroladores para o uso no campo, principalmente para o controle de patógenos

de solo, no tratamento de sementes; e no armazenamento pós-colheita de frutas e hortaliças.

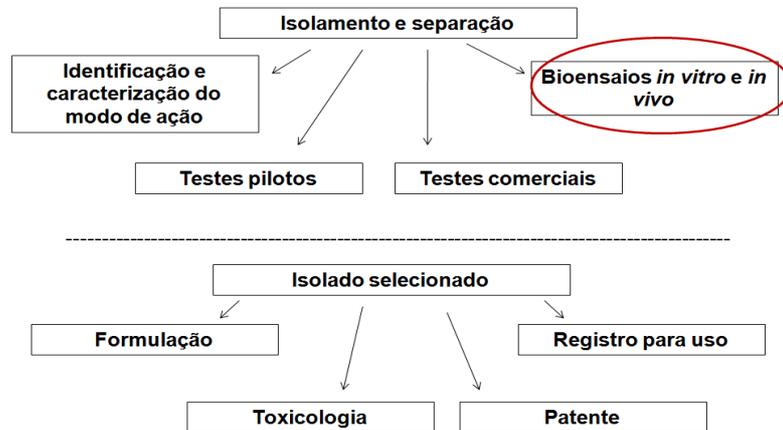


Figura 3 – Passos envolvidos na fabricação de um produto biocontrolador.

Fonte: Droby et al., 2009.

Adaptação: Hamann, 2011.

Existem várias formulações à base de colônias bacterianas, como *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp.. Esses dois gêneros são rizobactérias, promotoras de crescimento e com um amplo potencial biocontrolador (SHEN, 1997). Espécies fúngicas são, também, periodicamente investigadas e apresentam comprovado desempenho como bicontroladores; executando os referidos modos de ação da interação antagonista durante a “convivência” com o patógeno (VERMA et al., 2007). Nas formulações fúngicas, as colônias são veiculadas com substrato inerte, que pode servir ao mesmo tempo como meio de cultivo, fornecedor de nutrientes. Geralmente, são usados como substratos, casca ou grão integral de cereais triturados ou polímeros, como alginato de sódio ou pectina cítrica (MORETINI; MELO, 2007).

Ainda que tentativas de substituição do controle químico pelo biológico por meio da aplicação de produtos bicontroladores sejam feitas, o controle de fitomoléstias, de modo geral, ainda apresenta o tratamento químico como uma solução mais imediatista, pois em curto prazo, essa prática ainda é a mais eficiente, podendo trazer resultados e atender a demanda de mercado em menor tempo; porém, o incremento dos custos desse controle, os riscos de aquisição de

resistência aos produtos pelos fitopatógenos e, evidentemente, os problemas ambientais advindos do seu uso consecutivo, indicam a necessidade de investimentos em alternativas mais ecológicas, colocando-se em grande destaque o controle biológico com a utilização de BCAs.

Segundo Delp (1980), fitopatógenos são geneticamente maleáveis e podem, através de mutações, tornarem-se resistentes a defensivos químicos específicos que atuam em um ou em poucos de seus processos metabólicos vitais. No meio ambiente, a longa persistência e a difícil decomposição de algumas moléculas orgânicas, componentes dos defensivos químicos, são alguns dos principais fatores que contribuem para o impacto do controle químico (SILVA; FAY, 2004). Outra grande preocupação, também, a qual pode afetar diretamente a saúde do consumidor, é o emprego de defensivos químicos em produtos agrícolas, frutas e hortaliças, destinados diretamente ao consumo *in natura*, por meio da aplicação de produtos químicos na superfície de frutas e hortaliças durante o manejo pós-colheita (transporte e armazenamento) (SHARMA et al., 2009).

Dentre os fungos biocontroladores, alguns gêneros importantes como o *Trichoderma* apresentam espécies que exercem antagonismo sobre fitopatógenos através de parasitismo, competição (Figura 4) e antibiose, as quais, além de biocontroladoras, têm sido usadas como promotores de crescimento, por exemplo, na germinação de sementes (ETHUR et al., 2006). Isolados de *Trichoderma* spp. são conhecidos pela habilidade em produzir enzimas e metabólitos extracelulares voláteis e não voláteis, como exoglucanases, endoglucanases, celobiases, quitinases e celulases, responsáveis pela degradação e lise da parede celular de fungos e oomicetos fitopatogênicos (HARMAN et al., 2004; RIDOUT et al., 1988; PAPAIVIZAS, 1985; ELAD et al., 1982). Isolados de *Trichoderma* spp. têm sido empregados como agentes antagonistas de doenças fúngicas em plantas. Muitas espécies de patógenos fúngicos são suscetíveis ao ataque de *Trichoderma* spp., *Botrytis cinerea* é uma delas. Alguns trabalhos pioneiros relatando essas duas espécies podem ser encontrados na literatura (GULLINO, 1992; TRONSMO, 1991; TRONSMO; DENNIS, 1977). Um dos trabalhos mais notáveis foi realizado por Tronsmo e Dennis (1977), que utilizaram *Trichoderma* no controle de podridão de *Botrytis* em morango (*Fragaria x ananassa* 'Dover'), em que a aplicação de suspensão do antagonista no campo durante a floração diminuiu a incidência do fungo durante o armazenamento dos frutos. Outro gênero de fungo antagonista que

apresenta um grande potencial biocontrolador é *Gliocladium*, sendo este microrganismo versátil em termos de nichos ecológicos, frequentemente encontrado em solos cultivados, agindo como biodegradador de ácidos fenólicos, e em partes áreas de plantas (KRAUSS et al., 2001; SUTTON et al., 1997). O antagonismo entre *B. cinerea* e *Gliocladium* envolve competição por nutrientes em tecidos vegetais com ferimentos e em folhas e flores senescentes (YU; SUTTON, 1997), parasitismo (XUE, 2003; SUTTON et al., 1997), e possivelmente indução de resistência no hospedeiro (SUTTON et al., 1997).

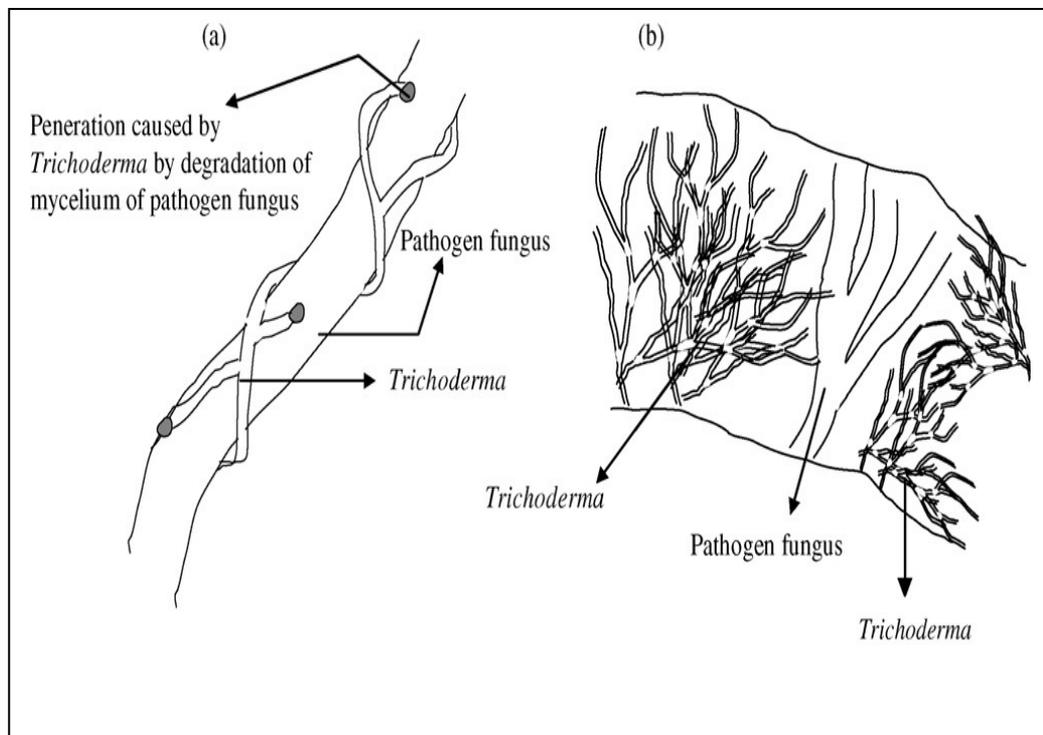


Figura 4 – Dois exemplos de mecanismos envolvidos no antagonismo exercido por *Trichoderma*: a) micoparasitismo: o micélio de *Trichoderma* penetra e invade o micélio do patógeno promovendo a sua degradação, b) competição: *Trichoderma* e patógeno competem juntos pelo mesmo espaço e por nutrientes do meio.

Fonte: Verma et al., 2007

No Brasil, um dos primeiros produtos biológicos com BCAs foi formulado a partir de *Trichoderma* (*T. viride* Per.) e empregado no controle da podridão de raízes e colo em macieira, causada por *Phytophthora cactorum* Lebert & Cohn

(VALDEBENITO-SANHUHEZA, 1991). O agente de controle biológico foi selecionado pela capacidade de colonizar o solo e proteger as mudas após o plantio. A primeira empresa privada responsável pela produção massal e comercialização de *Trichoderma* no Brasil iniciou as atividades em 1992 no Rio Grande do Sul. Posteriormente diversas outras empresas surgiram no mercado, existindo mais de uma dezena de produtos comerciais em uso no país. Bettiol e Mornadi (2009) realizaram um levantamento caracterizando a situação do mercado de *Trichoderma* no Brasil. No estudo foram identificadas 13 empresas que produzem e comercializam o *BCA*, constatando que as mesmas se restringem à região Centro-Sul. Todas as empresas utilizam uma técnica de fermentação sólida em grãos de arroz, milho ou outros cereais, sendo o volume de produção em torno de 550 t.ano⁻¹ de grãos. As formulações disponíveis incluem: pó-molhável; grânulos dispersíveis; suspensão concentrada; óleo emulsionável; grãos colonizados e esporos secos. *T. asperellum* (Samuels, Lieckf. & Nirenberg), *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudem., *T. stromaticum* Samuels, e *T. viride* Pers. são as principais espécies do agente de biocontrole comercializadas.

Na vitivinicultura, há várias décadas tem-se tentado implantar meios de controle de doenças alternativos nos parreirais, por questões ambientais, visando à diminuição do emprego do tratamento químico e à supressão de resistência de doenças a fungicidas. Em áreas de cultivo do Rio Grande do Sul, mais especificamente na região da serra, tem surgido a proposta da utilização de fungos micorrízicos, que atuam de maneira simbiótica com outras plantas por meio das micorrizas. Os micorrízicos podem auxiliar na proteção da videira junto ao solo, pois a partir do momento que colonizam a planta, modificam seu estado hormonal. Dessa forma, conseguem atuar no microespaço entre raiz e solo, impedindo a aproximação de várias moléstias de solo. Na videira estudos de biocontrole de *B. cinerea* têm sido conduzidos com isolados de fungos epífitos e com isolados de *Trichoderma*, avaliaram-se também colonizadores endofíticos dessa cultura para proteção de mudas com o objetivo de reduzir as perdas causadas pela fusariose. A adoção do controle biológico no vinhedo, entretanto, apresenta ainda grandes empecilhos na utilização de *BCAs* devido à impossibilidade de controle das condições ambientais, que podem ser letais aos antagonistas produzidos em laboratório (KRETZSCHMAR, 1991). Na pós-colheita, em condições de armazenamento, o biocontrole através da utilização de *BCAs* torna-se economicamente viável, devido ao controle das

condições ambientais e limitação da área de aplicação (WILSON; PUSEY, 1985). No entanto, a viabilidade econômica de um sistema de produção é um fator que afeta diretamente o produtor rural e talvez deva ser o primeiro a ser considerado para a maior aceitação do controle biológico. Se existirem viabilidade econômica e eficácia no método, existe também o estímulo para o agricultor usar o insumo biológico (BETTIOL; MORANDI, 2008). Ainda são poucos os produtos no Brasil formulados a partir de *Gliocladium*, porém em outras regiões do mundo esse microrganismo é empregado para a formulação de produtos de biocontrole, utilizados principalmente para o controle de patógenos veiculados pelo solo (FRAVEL, 2005; MELO, 1996).

Botrytis cinerea isolado de uvas viníferas é suscetível à ação antagonista de fungos como *Trichoderma* e *Gliocladium* no controle do seu crescimento *in vitro*, possibilitando a avaliação de diferentes isolados desses gêneros antagonistas para futuras formulações de produtos biológicos a serem aplicadas diretamente no campo ou na pós-colheita para o controle da podridão-cinzenta. Em vista disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o antagonismo, o crescimento micelial e a esporulação *in vitro* entre isolados do fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea*, coletados de vinhedos da serra gaúcha e da campanha meridional, e isolados dos fungos antagonistas *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* sp.

1.2 Material e métodos

1.2.1 Coleta do material fúngico e obtenção dos isolados

Botrytis cinerea foi coletado em vinhedos pertencentes à vinícola *Miolo S.A.*, nos municípios de Bento Gonçalves (serra gaúcha) e Candiota (campanha meridional), em março de 2010. Foram coletadas várias amostras de cachos com sintomas de podridão-cinzenta das cultivares viníferas 'Cabernet Sauvignon' e 'Tanat', apenas da primeira em Bento Gonçalves e de ambas em Candiota. As amostras receberam uma identificação de acordo com sua procedência, segundo a região, a cultivar, a linha, a planta e o cacho. A Figura 5 ilustra esquematicamente como a coleta foi realizada.

A primeira etapa da coleta iniciou-se com a identificação dos parreirais que apresentavam plantas com cachos atacados por *B. cinerea*. Em seguida, realizou-se a demarcação das coordenadas geográficas e a identificação das linhas de cultivo e suas respectivas plantas contendo cachos com sintomas. Nesse procedimento, o coletor assumiu um único sentido de entrada para cada linha do parreiral, exercendo, assim, a coleta numa direção padronizada. O material coletado foi encaminhado ao laboratório para ser submetido ao isolamento fúngico. As amostras receberam a identificação segundo suas características de procedência (Figura 6) e, em seguida, foram isoladas, com a ajuda de uma pinça metálica, estruturas de micélio e conidióforo, presentes nas bagas atacadas, para placas de Petri com meio de cultura formulado com batata, dextrose e água (meio BDA). O material fúngico foi periodicamente repicado para outras placas com BDA e purificado para, conseqüentemente, ser submetido aos procedimentos do isolamento monospórico (CHOI et al., 1999).

Uma vez obtida uma quantidade mínima de isolados monospóricos para o estudo, abrangendo as duas regiões com as demais características adotadas, os mesmos foram encaminhados para a codificação, na qual receberam uma sigla, referenciando a universidade (Universidade Federal de Santa Maria - UFSM) e a região (Serra Gaúcha – SG, Campanha Meridional – CM) onde o estudo e a coleta foram realizados, respectivamente. Na Tabela 1, a descrição desses códigos pode ser melhor observada.

Os isolados antagonistas foram obtidos de maneiras distintas, alguns já faziam parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi, os quais foram reisolados e cultivados em meio de cultura BDA, e outros foram isolados do material vegetal infectado com *B. cinerea*, no qual se apresentaram como fungos saprófitos. Foi utilizado material de *BCA* das espécies *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* sp.. Os isolados de *Trichoderma* somaram quatro no total (UFSM T15.1, UFSM T17, UFSM T20, UFSM TSG e UFSM TCM). Os antagonistas UFSM T15.1 e UFSM T17, da coleção, foram coletados e identificados por Menezes (2007), os quais mostraram resultados eficazes no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*; os mesmos também foram submetidos a caracterização molecular, demonstrando que UFSM T17 possui 99% de similaridade

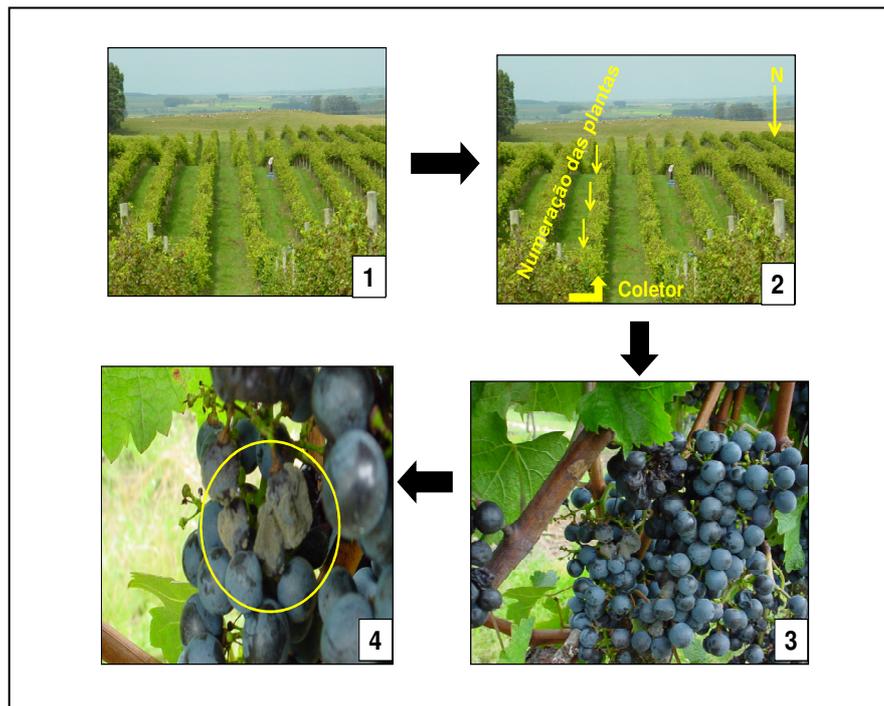


Figura 5 – Coleta de material fúngico para a obtenção dos isolados de *B. cinerea*. 1) escolha do parreiral; 2) estabelecimento das coordenadas geográficas e numeração de linhas e plantas; 3) identificação de plantas com cachos infectados por *B. cinerea*; 4) coleta das bagas com sintomas. Candiota, RS, 2010.

Fotos: Hamann, 2010



Figura 6 – Identificação do material coletado, segundo cultivar, planta, linha, cacho e município. Santa Maria, RS, 2010

Foto: Hamann, 2010

filogenética com a espécie *T. aureoviride* e UFSM T15.1 possui similaridade com *T. koningiopsis*.

Tabela 1 – Código dos isolados de *B. cinerea* com a descrição da cultivar de *Vitis vinifera*, área, numerações da linha, planta e cacho e localização dos vinhedos de coleta. Santa Maria, RS, 2011.

| Isolado/Código | Cultivar | Área | Linha | Planta | Cacho | Local |
|----------------|----------------------|------|-------|--------|-------|----------------------|
| UFSM SG 01 | 'Cabernet Sauvignon' | 0,64 | 1 | 19 | 1 | Bento Gonçalves - RS |
| UFSM SG 02 | 'Cabernet Sauvignon' | 0,64 | 3 | 65 | 1 | Bento Gonçalves - RS |
| UFSM SG 03 | 'Cabernet Sauvignon' | 0,64 | 3 | 54 | 1 | Bento Gonçalves - RS |
| UFSM CM 01 | 'Tanat' | 5,48 | 1 | 3 | 1 | Candiota - RS |
| UFSM CM 02 | 'Cabernet Sauvignon' | 6,76 | 2 | 2 | 1 | Candiota - RS |

O isolado UFSM T20 não foi caracterizado molecularmente, tendo sido coletado do rizoplano de tomateiro cultivado em estufa e testado por Ethur et al (2005) no controle de *S. sclerotiorum* nos rizoplanos de pepineiro (*Cucumis sativus* L.) e tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). A única espécie de isolado de gênero distinto testada neste trabalho, *Gliocladium* sp. (UFSM G4DB), foi coletada em solo rizosférico sob sistema de semeadura direta em lavoura de soja (*Glicine max* (L.) Merr.). Optou-se por essa espécie devido à grande referência como biocontroladora de *B. cinerea* (COTA, 2008; NOBRE et al., 2005; MORANDI et al., 2003). Os isolados de *Trichoderma* spp. que já faziam parte da micoteca do Laboratório Elocy Minussi, estiveram armazenados em substrato, farelo de arroz triturado, dentro de caixas de Gerbox de 250 mL, mantidos sob temperatura de 4°C em refrigerador comum; e o isolado UFSM G4DB, outro integrante da micoteca do laboratório, encontrava-se preservado em meio sílica liofilizada também sob temperatura de 4°C em refrigerador comum. Os isolados de *Trichoderma* UFSM

TSG e UFSM TCM foram aqueles purificados do material advindo do campo para este estudo, os quais foram armazenados em placas de Petri com BDA a 20°C em BODs. Na Tabela 2 encontram-se a codificação e dados da origem desses antagonistas.

1.2.2 Local

O experimento foi conduzido no laboratório de fitopatologia Elocy Minussi do Departamento de Defesa Fitossanitária (DFS), localizado no Centro de Ciências Rurais (CCR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul, no período de outubro de 2010 a janeiro de 2011.

1.2.3 Crescimento micelial e esporulação de *Botrytis cinerea* e dos antagonistas *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* sp.

Após as amostras fúngicas terem sido isoladas em meio BDA, as mesmas foram cortadas em forma de discos de 10 mm e transferidas para novas placas de Petri vertidas com o mesmo meio de cultura. Cada nova placa recebeu um disco de micélio fúngico colocado em seu centro e, em seguida, essas foram incubadas a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, por um fotoperíodo de 12 horas, durante cinco dias. Após o quinto dia, realizou-se, então, a mensuração do crescimento micelial e a contagem de esporos.

Para calcular o crescimento micelial, as medidas foram tomadas, com o auxílio de um paquímetro digital, em duas direções perpendiculares de sentidos opostos com marcação no fundo de cada placa, para que a aferição de cada repetição fosse direcionalmente padronizada (Figura 7). Calculou-se a média em função das medidas dessas duas direções, e diminuiu-se 10 mm correspondentes ao tamanho de cada disco.

Tabela 2 – Código dos isolados de antagonistas com a descrição da origem segundo parte do sistema solo-planta e da espécie agrícola. Santa Maria, RS, 2011.

| Isolado/Código | Espécie | Origem | Local |
|----------------|---------------------------------|---|----------------------|
| UFSM T20 | <i>Trichoderma</i> sp. | solo rizoplano tomateiro | Santa Maria - RS |
| UFSM T15.1 | <i>Trichoderma koningiopsis</i> | solo rizosférico semeadura direta/ soja | Cruz Alta - RS |
| UFSM T17 | <i>Trichoderma aureoviride</i> | solo rizosférico semeadura direta/ soja | Cruz Alta - RS |
| UFSM TSG | <i>Trichoderma</i> sp. | parte aérea/ videira | Bento Gonçalves – RS |
| UFSM TCM | <i>Trichoderma</i> sp. | parte aérea/ videira | Candiota - RS |
| UFSM G4DB | <i>Gliocladium</i> sp. | solo rizosférico semeadura direta/ soja | Cruz Alta - RS |

A quantificação da esporulação foi feita através da lavagem do meio de cultura contendo as estruturas fúngicas, dentro das placas de Petri, com 3 mL de água destilada e esterelizada. As colônias foram, então, raspadas com o auxílio de uma alça de Drigalski para a liberação de micélio e conídios. O lavado fúngico foi, em seguida, transferido para *beckers*, nos quais foi diluído em 100 mL de água destilada e esterelizada, acrescido de 2 gotas de emulsificante *Tween 80*[®], formando a suspensão, a qual foi homogeneizada, durante 3 minutos, em agitador do tipo Fisher-Flexa MixTM (USA). Uma alíquota de suspensão foi, então, pipetada, com uma pipeta volumétrica, para um hemacitômetro (câmara de *Neubauer*) (Figura 8). A leitura foi feita com o auxílio de um microscópio ótico, permitindo estimar o número de conídios por mL de suspensão.

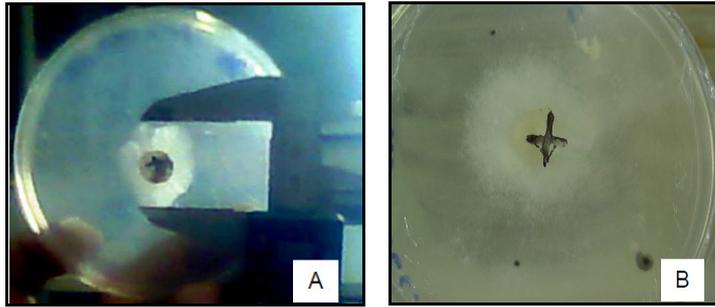


Figura 7 – A) Medição do crescimento de uma colônia fúngica utilizando paquímetro digital; B) detalhe dos dois sentidos perpendiculares. Santa Maria, RS, 2009.
Foto: Rodrigues, 2009.



Figura 8 – Câmara de Neubauer em microscópio ótico para contagem de conídios. Santa Maria, RS, 2010.
Foto: Hamann, 2011

1.2.4 Pareamento de culturas

Para o teste de pareamento de culturas, um disco de micélio de 10 mm de diâmetro de cada isolado do patógeno foi colocado a 0,5 cm do bordo da placa de Petri, com diâmetro de 9 cm, contendo meio BDA. As placas foram incubadas por 48 horas a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, foi repetida a operação, colocando-se outro disco de micélio de 10 mm de diâmetro de cada isolado do antagonista na outra extremidade da placa, também a 0,5 cm do bordo. As placas, em seguida, voltaram para a incubação, ali permanecendo por mais cinco

dias, sendo realizada, ao final do sétimo dia, a leitura do crescimento das duas colônias em confronto (Figura 9), permitindo assim estimar a atividade de biocontrole.

1.2.4.1 Estimativa da atividade de biocontrole

Para estimar a atividade de biocontrole, foi feita uma adaptação do método proposto por Raspor et al. (2010), os quais determinaram-na *in vitro* testando espécies de leveduras em confronto direto com *B. cinerea*. Nesse estudo, o cálculo da atividade de biocontrole foi feito baseado no crescimento radial do patógeno em direção ao antagonista e o intervalo entre a extremidade do crescimento radial atingido por *B. cinerea* e uma linha, na extremidade oposta, onde uma suspensão de esporos do antagonista foi inoculada.

Raspor et al. (2010) calcularam a distância de inibição (*distância 1*), através do intervalo entre a linha demarcada e o limite atingido pelo crescimento micelial de *B.cinerea*, e o crescimento micelial do patógeno em direção ao antagonista (*distância 2*), chegando-se a seguinte fórmula:

$$A.B. (\%) = [(distância\ 1)/(distância\ 1 + distância\ 2)] \times 100 \quad (1)$$

Para o presente estudo, foi adotado um método de mensuração entre duas colônias fúngicas, uma patogênica e outra antagonista, ou seja, *B. cinerea* e *Trichoderma* spp. ou *Gliocladium* sp.. Desta maneira tomou-se a medida do crescimento radial do patógeno, partindo-se do centro do disco de micélio até a extremidade atingida pelo crescimento micelial, considerando esta distância como a *distância 2*, e a distância de inibição, isto é, a *distância 1*, foi considerada desde o centro do disco de micélio do antagonista até a extremidade do crescimento radial atingido pelo patógeno. Após adaptar *D1* e *D2* para o presente trabalho, a atividade de biocontrole (*A.B.*) seguiu sendo calculada de acordo com a fórmula proposta pelos autores.

1.2.5 Procedimento estatístico

O experimento consistiu-se em três ensaios, sendo esses: 1) avaliação do crescimento individual das colônias de fungos dos isolados do patógeno e dos isolados dos antagonistas; 2) contagem de esporos de ambos os agentes, e 3) seu pareamento no teste de confronto direto.



Figura 9 – Crescimento micelial atingido ao final do sétimo dia de incubação do confronto direto, isolados UFSM CM 02 x UFSM T20. Santa Maria, RS, 2010.

Foto: Hamann, 2010

Para todos os ensaios, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, os quais foram compostos pelos níveis isolados de *B. cinerea* (UFSM SG 01, UFSM SG 02, UFSM SG 03, UFSM CM 01 e UFSM CM 02), *Trichoderma* spp. (UFSM T20, UFSM T15.1, UFSM T17, UFSM TSG e UFSM TCM) e *Gliocladium* sp. (UFSM G4DB). Cada tratamento teve 4 repetições em todos os ensaios. No confronto direto foi calculada a atividade de biocontrole, adotando-se a equação proposta por Raspor et al. (2010), em seguida os valores foram submetidos a transformação de $\sqrt{x+k}$, com $k=100$. O conjunto de dados dos três ensaios foi submetido à ANOVA e ao teste de médias, adotando-se o teste Tukey a 5% de probabilidade de erro. Para o procedimento das análises foi usado o *software* estatístico SANEST (ZONTA; MACHADO, 1984).

1.3 Resultados e discussão

1.3.1 Crescimento micelial e esporulação de *Botrytis cinerea* e dos antagonistas *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* sp.

Os isolados de *B. cinerea* (Tabela 3) não diferiram estatisticamente quanto ao crescimento micelial, ou seja, todos eles assemelharam-se estatisticamente quanto ao aumento do diâmetro de suas colônias. Na contagem de esporos houve, porém, efeito significativo, obtendo-se diferenças na esporulação entre os mesmos (Tabela 4).

Isolados de fungos de uma mesma espécie, mesmo que oriundos de locais diferentes, geralmente tendem a apresentar grande similaridade em vários aspectos morfológicos e fisiológicos, sendo o crescimento micelial um deles. No caso de *B. cinerea*, o mesmo também ocorre com isolados coletados de hospedeiros diferentes, ou seja, cultivares de uma mesma espécie ou espécies hospedeiras distintas. Por isso, na maioria das vezes o crescimento e a expansão micelial estão muito mais relacionados à incidência de fatores ambientais externos, como a disponibilidade de nutrientes e as condições do meio (temperatura e umidade, por exemplo), do que características genéticas intrínsecas do próprio microrganismo (MUÑOZ et al., 2002, GIRAUD et al., 1999; GIRAUD et al., 1997). Chang et al. (2001), em testes de incidência e patogenicidade de *B. cinerea* em *Cryptotaenia japonica* (Thunb.) Lindl. ex Spach, não observaram grandes diferenças de crescimento do diâmetro das colônias de três isolados do fungo oriundos de diferentes regiões geográficas da Coreia do Sul, apenas mudanças na temperatura influenciaram para que ocorresse uma pequena variação no crescimento micelial, porém com todos eles seguindo um comportamento semelhante, ou seja, diminuição de crescimento em temperaturas abaixo de 10°C e acima de 25°C.

Tabela 3 – Crescimento micelial (cm) *in vitro* de isolados de *B. cinerea* oriundos de vinhedos da serra gaúcha e da campanha meridional. Santa Maria, RS, 2011.

| Isolados de <i>B.cinerea</i> | Crescimento micelial (cm) |
|------------------------------|---------------------------|
| UFSM SG 01 | 85,65* a |
| UFSM CM 01 | 66,63 a |
| UFSM CM 02 | 64,16 a |
| UFSM SG 03 | 63,76 a |
| UFSM SG 02 | 60,35 a |

*Médias seguidas com letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

No caso dos isolados empregados no presente estudo, pode-se inferir, da mesma maneira, que a expansão do micélio de *B. cinerea* está fortemente relacionada às condições do meio em que o patógeno se encontra e atua. Condições ideais para a expansão do micélio desse fungo são representadas por temperaturas amenas entre 15°C e 28°C e alto teor de umidade, acima de 90% (BEEVER; WEEDS, 2007). Nos vinhedos da serra gaúcha, essas características climáticas são facilmente encontradas, resultando, muitas vezes, em podridões mais severas, em que *B. cinerea* não apenas incide no final do ciclo de produção, mas também, em anos muito chuvosos, já durante o crescimento vegetativo e a floração (SÔNEGO et al., 2003). Na campanha meridional, a ocorrência de epidemias da doença é mais rara. Em vinhedos dessa região, o final do ciclo de produção é o período que torna os cachos mais vulneráveis à incidência do patógeno e, conseqüentemente, ao crescimento e à expansão micelial sobre a epiderme das bagas, pois devido ao menor índice pluviométrico, são raras as condições epidêmicas da doença na fase vegetativa da cultura. Do contrário, muitas vezes, devido à característica do clima e ao comportamento de *B. cinerea* em determinada região, mais seco e danos causados pelo fungo abaixo dos níveis de severidade, respectivamente, como geralmente ocorre na campanha meridional, a podridão-cinzenta em uvas viníferas, pode tornar-se até mesmo uma alternativa econômica, através do investimento na produção do “vinho nobre” (RIBÉREAU-GUYON et al., 1980).

Tabela 4 – Esporulação dos isolados de *B. cinerea* (10^6 conídios.mL⁻¹) após cinco dias de incubação em placas de Petri com meio BDA. Santa Maria, RS, 2011.

| Isolados de <i>B.cinerea</i> | Esporulação (10^6 conídios.mL ⁻¹) |
|------------------------------|--|
| UFSM SG 03 | 5,56 a* |
| UFSM SG 01 | 3,84 b |
| UFSM SG 02 | 1,69 c |
| UFSM CM 02 | 1,64 c |
| UFSM CM 01 | 0,97 d |

* Médias seguidas por letras iguais não diferiram entre pelo teste Tukey a 5%.

Na contagem de esporos, UFSM SG 03 apresentou em média $5,56 \times 10^6$ conídios.mL, ou seja, a maior concentração, distanciando-se estatisticamente dos demais isolados. Somente UFSM SG 02 e UFSM CM 02 não apresentaram diferenças entre si. Esse comportamento pode ter a mesma origem da discutida no crescimento micelial, em que as condições do meio fortemente influenciam sobre características como crescimento e, neste caso também, produção. Grandes diferenças podem ser observadas na esporulação de fungos no campo e *in vitro*. Para os isolados de *B. cinerea* utilizados neste estudo pode-se inferir que as diferentes médias encontradas nem sempre correspondem às médias obtidas a campo, onde os fatores ambientes não podem ser controlados.

A esporulação tem relação com a produção de fontes de inóculo, ou seja, quanto maior a esporulação de um fungo, aliada a fatores favoráveis do meio e do clima, maiores são as chances de ocorrência de infecções, o que para o patossistema *B. cinerea* x *Vitis vinifera* pode ser traduzido pela grande oferta de nutrientes e condições de temperatura amena e alta umidade, respectivamente (SÔNEGO et al., 2003). Contudo, essa relação nem sempre está diretamente associada, pois a viabilidade de esporos depende também de alguns mecanismos intrínsecos. Em determinadas situações, como uma alta concentração de esporos, os mesmos podem prevenir-se do processo de germinação por fatores não totalmente ainda esclarecidos (AGRIOS, 2005). Desse modo, a densidade conidial não apenas influencia na germinação e nas demais atividades de pré-penetração no tecido do hospedeiro, mas também pode, como também não, influenciar nos

processos subsequentes. A esporulação é um fator decisivo no processo doença, durante seu ciclo (Figura 10), é ela quem determina o desencadeamento tanto dos ciclos primários quanto secundários das doenças.

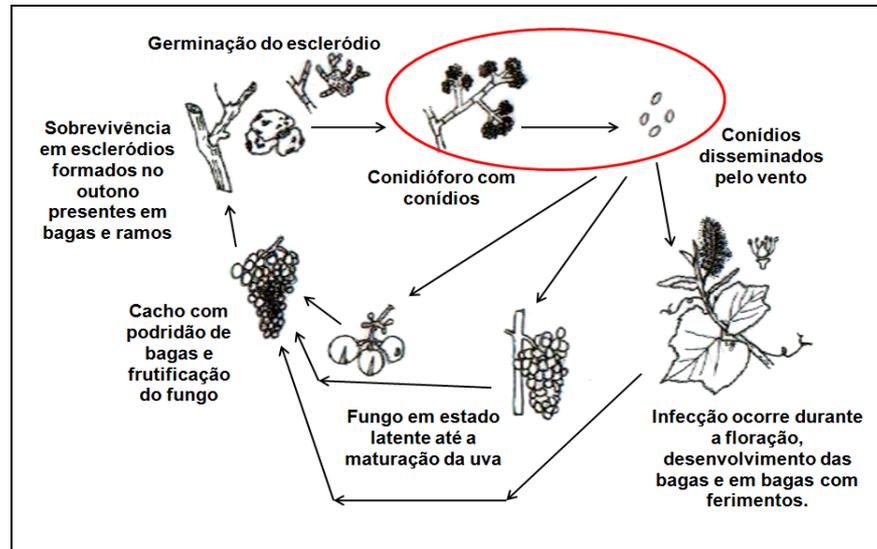


Figura 10 – Ciclo da podridão-cinzenta da uva no vinhedo. Em destaque: produção de esporos - fonte de inóculo - durante o ciclo da doença.
Fonte: Garrido, 2003.

A redução da produção de inóculo pelo patógeno através da supressão da sua habilidade infectiva pode criar um efeito acumulativo sobre diversos ciclos de determinada doença em patossistemas, em que o inóculo produzido no campo é o maior fator contribuinte para o desenvolvimento de epidemias (KÖHL; FOKKEMA; 1993): A esporulação de *B. cinerea* pode ser suprimida através da ação de BCAs, como relataram Peng e Sutton (1991) no controle da podridão-cinzenta em morangueiro. No parreiral, os conídios produzidos durante o inverno e no início da primavera, assim como as demais estruturas envolvidas na sobrevivência do fungo, são considerados uma das unidades infectivas mais importantes e fator-chave para o desencadeamento da doença já em períodos que antecedem a maturação dos cachos (ELAD et al., 2007). Várias são as opções encontradas pelo agente patogênico no vinhedo e em seu entorno para a produção de inóculo, sabendo-se que Sutton et al. (1991) relataram mais de 200 espécies hospedeiras desse fungo, incluindo plantas daninhas entre outros tipos de material vegetal. No vinhedo e em

seu entorno, é bastante comum a ocorrência desses hospedeiros alternativos, que podem contribuir para a reincidência de *B. cinerea* nos parreirais.

Nos ensaios com os antagonistas, obtiveram-se as melhores médias com os isolados de *Trichoderma* spp., em ambos os estudos, crescimento micelial e esporulação. Em ordem decrescente, UFSM TSG, UFSM T15.1, UFSM TCM e UFSM T20 atingiram os maiores diâmetros de colônias (Tabela 5), enquanto que na esporulação destacaram-se UFSM T17 e UFSM T20 (Tabela 6).

O maior crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma* spp. em comparação com os isolados de *B. cinerea* pode refletir numa vantagem, já que um dos mecanismos do controle biológico desse antagonista é a competição por espaço ou nutrientes. Ghisalberti e Sivasithamparam (1991) relataram que o potencial hiperparasítico de espécies de *Trichoderma* sp. está relacionado com a competição por espaço e atividades metabólicas. Esse fator confere eficiência ao antagonista durante o hiperparasitismo de estruturas de fungos patogênicos.

O menor crescimento micelial entre os isolados antagonistas foi registrado por UFSM G4DB (*Gliocladium* sp.). Muitos microrganismos podem perder a sua capacidade metabólica após um longo período de incubação e dormência. Como o isolado UFSM G4DB havia sido liofilizado e armazenado em sílica, sua velocidade metabólica pode ter sido diminuída, mascarando sua classificação como antagonista, portanto, deverão ser realizados mais testes a cerca de sua capacidade de crescimento.

Na contagem de esporos, apenas dois isolados de *Trichoderma* diferiram dos demais, apresentando $1,89 \times 10^6$ e $2,39 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹ para UFSM T17 e UFSM T20, respectivamente. Na produção de uvas, as médias de esporulação de antagonistas podem refletir diretamente no desempenho do controle biológico no campo e na pós-colheita. Rodrigues (2009) também encontrou valores similares de esporulação para o isolado UFSM T17. O mesmo testou a esporulação do isolado em diferentes doses de adubo NPK, avaliando o efeito de doses no controle *in vitro*

Tabela 5 – Crescimento micelial (cm) dos isolados antagonistas de *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* sp. 5 dias após a incubação em placas de Petri em meio BDA. Santa Maria, RS, 2011.

| Isolados <i>BCAs</i> | Crescimento micelial (cm) |
|----------------------|---------------------------|
| UFSM TSG | 7,00 a* |
| UFSM T15.1 | 6,69 ab |
| UFSM TCM | 6,60 ab |
| UFSM T20 | 5,70 b |
| UFSM T17 | 3,75 c |
| UFSM G4DB | 0,96 d |

*Média de 4 placas. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si no teste de Tukey a 5%

Tabela 6 – Esporulação (conídios.mL⁻¹) dos isolados antagonistas (*BCAs*) (*Trichoderma* spp. e *Gliocladium* sp.) 5 dias após a incubação em placas de Petri com meio BDA. Santa Maria, RS, 2011.

| Isolados <i>BCAs</i> | Esporulação (10 ⁶ conídios.mL) |
|----------------------|---|
| UFSM T17 | 2,38 a |
| UFSM T20 | 1,89 a |
| UFSM TCM | 0,58 b |
| UFSM T15.1 | 0,50 b |
| UFSM TSG | 0,44 b |
| UFSM G4DB | 0,36 b |

*Média de 4 placas. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* sp. O isolado foi classificado por Rodrigues (2009) como biocontrolador com potencial antagonista intermediário. Sua capacidade de aumentar rapidamente a quantidade de inóculo pode refletir-se também em um agente de biocontrole de grande eficiência. Ethur (2006) selecionou o isolado UFSM T20 do rizoplane de tomateiro cultivado em estufa, sendo utilizado para o controle de populações de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*. Seu alto potencial de produção de esporos pode, da mesma forma, contribuir para o rápido aumento da quantidade de inóculo.

Os demais isolados, UFSM TSG, UFSM TCM e UFSM 15.1, obtiveram menor produção de esporos, porém apresentaram maiores valores de expansão micelial, o que pode refletir em vantagens no parasitismo sobre *B. cinerea* (ELAD, 1995; WISNIEWSKI et al., 1991; ADAMS, 1990).

1.3.2 Pareamento de culturas

No teste de pareamento de culturas, em que a atividade de biocontrole dos isolados antagonistas foi testada através de confronto direto com os isolados de *B. cinerea*, foi observado efeito significativo dos tratamentos sobre todos os isolados do patógeno. Os melhores resultados da atividade de biocontrole foram obtidos com UFSM TCM, UFSM TSG, UFSM T15.1 e UFSM T20, os quais obtiveram, em geral, médias de A.B. (atividade de biocontrole) acima de 50%. A tabela 7 apresenta os resultados obtidos na comparação das médias obtidas para todos os isolados de *B. cinerea*.

No pareamento de colônias fúngicas, *Trichoderma* spp. mostrou-se o mais eficiente na atividade de biocontrole de *B. cinerea*. Todos os isolados desse antagonista mostraram bons resultados no controle dos isolados do patógeno, variando entre si no nível de controle, de acordo com os isolados de *B. cinerea* testados. Não se obteve o mesmo efeito com o isolado de *Gliocladium* sp. (UFSM G4DB), não sendo eficiente no confronto direto com *B. cinerea* no presente estudo (Figura 11). O comportamento do isolado no pareamento de culturas já era esperado a partir do momento em que se observou seu baixo desempenho nos ensaios de crescimento micelial e esporulação *in vitro*. Segundo alguns autores (COTA et al., 2008; MORANDI et al., 2008, ORTIZ; ORDUZ, 2001; KÖHL et al., 1999), *Gliocladium* sp. é um bom controlador biológico, demonstrado por meio de bons resultados encontrados na literatura. Muitas vezes esse antagonista pode apresentar bons resultados *in vivo*, o mesmo não ocorrendo, no entanto, nos testes *in vitro*, pois muitos fatores podem estar correlacionados com esse comportamento, como por

Tabela 7 – Atividade de Biocontrole (A.B.) (%) dos isolados *BCAs* sobre os isolados de *B. cinerea* em confronto direto em meio de cultura BDA. Avaliação aos 5 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2011.

| Isolados de <i>Botrytis cinerea</i> | Isolados de <i>BCAs</i> | Atividade de biocontrole (A. B.) (%) |
|-------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| UFSM SG 01 | UFSM TSG | 63,05* a |
| | UFSM TCM | 61,79 a |
| | UFSM T15.1 | 55,00 ab |
| | UFSM T20 | 47,15 ab |
| | UFSM T17 | 37,00 bc |
| | UFSM G4DB | 21,51 c |
| UFSM SG 02 | UFSM TCM | 65,44 a |
| | UFSM T15.1 | 61,48 ab |
| | UFSM TSG | 57,85 ab |
| | UFSM T20 | 44,86 ab |
| | UFSM T17 | 34,93 bc |
| | UFSM G4DB | 11,23 c |
| UFSM SG 03 | UFSM TCM | 66,21 a |
| | UFSM T20 | 66,94 a |
| | UFSM T15.1 | 53,79 ab |
| | UFSM T17 | 52,85 ab |
| | UFSM TSG | 49,76 ab |
| | UFSM G4DB | 21,05 b |
| UFSM CM 01 | UFSM TSG | 76,97 a |
| | UFSM TCM | 69,78 ab |
| | UFSM T15.1 | 60,22 abc |
| | UFSM T20 | 48,03 bc |
| | UFSM T17 | 44,34 c |
| | UFSM G4DB | 19,02 d |
| UFSM CM 02 | UFSM TSG | 48,87 a |
| | UFSM T20 | 44,59 a |
| | UFSM T17 | 44,47 a |
| | UFSM TCM | 40,69 a |
| | UFSM T15.1 | 39,07 a |
| | UFSM G4GB | 16,06 b |

* Médias seguidas por letras iguais, dentro de cada isolado de *B. cinerea*, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

exemplo, temperatura, umidade, pH e nutrientes podem ser uma explicação para a delonga do crescimento micelial e da esporulação.

O gênero *Trichoderma* já vem sendo testado há muitas décadas no controle biológico de agentes fitopatogênicos fúngicos. Os isolados deste trabalho obtiveram um bom desempenho, mesmo aqueles não obtidos de cachos de uva. Assim sendo, os isolados UFSM T20, UFSM T17 e UFSM T15.1 (Figura 12), oriundos de solo, demonstraram um bom desempenho no controle de *B. cinerea* isolado de cachos de uva. Isso demonstra uma grande vantagem para formulação de produtos biológicos para serem aplicados diretamente no vinhedo ou no armazenamento pós-colheita, não havendo a necessidade dos agentes antagonistas serem coletados do mesmo hospedeiro do patógeno ou no mesmo local onde a doença esteja incidindo, sendo por isso, segundo Baker et al. (1985), uma grande vantagem no encurtamento da etapa de seleção de antagonistas.



Figura 11 – Confronto direto de UFSM SG02 x UFSM G4DB. *B. cinerea* cresce por toda a placa não sendo afetado pelo crescimento de *Gliocladium* sp.. Santa Maria, RS, 2010.
Foto: Hamann, 2010.

Para os isolados antagonistas oriundos das mesmas lesões de *B. cinerea* em bagas de uva, como é o caso de UFSM TSG e UFSM TCM (Figura 12), constatou-se o que muitos autores já discutem: as chances de obtenção de micro-organismos efetivamente antagônicos são maiores quando o isolamento do antagonista é feito a

partir da mesma cultura ou do mesmo ambiente em que o patógeno causa a infecção (SUDO, 1989; LOPES, 1986).

Apesar do gênero *Trichoderma* ser basicamente encontrado no solo, Harman (1996) descreve sua ocorrência também em outros ambientes, porém com uma frequência muito menor, pois não é muito comum encontrar o antagonista na parte aérea de plantas, como em cachos de videira, no caso específico deste estudo. Contudo, há relatos da existência de colônias de epífitas de *Trichoderma* na parte aérea de trigo (*Triticum aestivum* L.) (MANGIAROTTI et al., 1987; BILES; HILL, 1983).

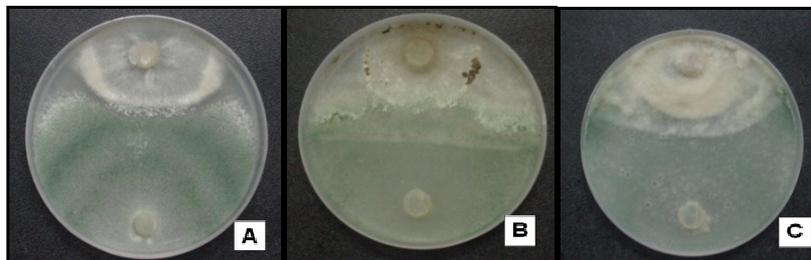


Figura 12 – Atividade de Biocontrole (%) *in vitro* de isolados de *Trichoderma* sp. em confronto direto com *Botrytis cinerea*. (A) UFSM TCM, (B) UFSM TSG e (C) UFSM T15.1 (C). Santa Maria, RS, 2010.
Foto: Hamann, 2010.

1.4 Comentários finais

Entre os principais resultados obtidos nos testes de antagonismo *in vitro*, observamos que os isolados de *B. cinerea*, advindos de vinhedos do Rio Grande do Sul, apresentam valores de crescimento micelial idênticos e valores de esporulação distintos. Pressupõe-se com isso que o ambiente de crescimento possui um papel determinante sobre essas variáveis, podendo ser mudanças meteorológicas ou fornecimento de nutrientes, que contribuem para a colonização do hospedeiro e produção de inóculo, delegando, dessa maneira, o crescimento micelial e a esporulação, respectivamente.

Para os isolados BCAs, os maiores valores de crescimento micelial obtidos pelos isolados de *Trichoderma* (UFSM TSG, UFSM TCM e UFSM T15.1) são uma

prévia importante do potencial antagonista desse gênero no parasitismo de *B. cinerea*. Já o isolado UFSM G4DB (*Gliocladium* sp.) não apresenta um bom crescimento micelial e boa esporulação *in vitro*, necessitando de novos testes ou de testes *in vivo* para verificar seu comportamento.

No pareamento de culturas, os isolados de *Trichoderma* (UFSM T20, UFSM T17, UFSM T15.1, UFSM TCM e UFSM TSG) apresentam no geral uma boa atividade de biocontrole (A.B) sobre *B. cinerea*.

As características individualizadas de crescimento micelial e de esporulação de isolados do patógeno e de antagonistas podem ser maximizadas através de testes de confronto direto, nos quais os antagonistas de melhor desempenho possam ser isolados para o cultivo *in vitro* e futuramente empregados em formulações de produtos biológicos para aplicação a campo ou no armazenamento pós-colheita.

1.5 Referências

ADAMS, P.B. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 72, p. 58-73, 1990.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2005. 922 p.

BAKER, C. J. et al. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. **Plant Diseases**, v. 69, p. 770-772, 1985.

BARKAI-GOLAN, R. **Postharvest diseases of fruit and vegetables**: development and control. Amsterdã: Elsevier, 2001. 418 p.

BEEVER, R. E.; WEEDS, P. L. *Botrytis* taxonomy and genetic variation. In: ELAD, Y. et al. **Botrytis**: Biology, Pathology and Control. Amsterdã: Springer, 2007. p. 29-48.

BÉLAGER, R. R. et al. 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**, v. 5, p. 41-53, 1995.

BENHAMOU, N; CHET, I. Parasitism of Sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. **Phytopathology**, v. 86, p. 405-416, 1996.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (eds.). **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 717-727.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds). **Biocontrole de doenças de plantas**: uso e perspectivas. 1. ed. Jaguariúna: EMBRAPA, 2009. cap. 1, p. 7-14.

BHATT, D. D.; VAUGHAN, E. K. Preliminary investigations on biological control of grey mould (*Botrytis cinerea*) of strawberries. **Plant Disease Reporter**, v. 46, p. 342-345, 1962.

BILES, C. L.; HILL, J. P. The effect of *Trichoderma hamatum* on the sporulation capacity of *Cochliobolus sativus* lesions excised from winter wheat seedling leaves. **Phytopathology**, v. 73, n. 5, p. 820, 1983.

CHOI, Y. W.; HYDE, K. D.; HO, W. H. Single spore isolation of fungi. **Fungal Diversity**, v. 3, p. 29-38, 1999.

CHANG, S. W. et al. Occurrence of Gray Mold Caused by *Botrytis cinerea* on *Cryptotaenia japonica* in Korea. **Mycobiology**, v. 29, n. 4, p. 227-229, 2001.

COTA, L. V. **Clonostachys rosea no controle biológico e manejo integrado do mofo cinzento do morangueiro**. 2008. 96 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

DELP, C. J. Coping with resistance to plant disease control agents. **Plant Disease**, v. 64, p. 651-657, 1980.

DROBY, S. et al. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and Technology**, v. 52, p. 137-145, 2009.

DUBOS, B. Biological control of *Botrytis*, State-of-the-art. In: VERHOEFF, K; MALATHRAKIS, N. E; WILLIAMSON, B. (eds). **Recent Advances in Botrytis Research**. Wageningen: Pudoc Scientific Publishers, 1992. p. 169-178.

ELAD, Y. et al. **Botrytis**: biology, pathology and control. Dordrecht: Springer, 2007. 403 p.

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

ELAD, Y. Biological control of grape grey mould by *Trichoderma harzianum*. **Crop Protection**, v. 13, p. 35–38, 1994.

ELAD, Y. et al. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 28, p. 719–725, 1982.

ETHUR, L. Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. 2006. 155 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

ETHUR, L. R. et al. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira.**, v. 30, n. 2, p. 127-133, 2005.

FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 337-359, 2005.

GHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp, **Soil Biology and Biochemistry**, v. 23, p. 1011–1020, 1991.

GIRAUD, T. et al. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuma*, are found in sympatry on numerous host plants. **Phytopathology**, v. 89, p. 967– 973, 1999.

GIRAUD, T. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinita fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, p. 1177–1185, 1997.

GUILLINO, L. M. Control of *Botrytis* rot of grapes and vegetables with *Trichoderma* spp. In: TJAMOS, E. C; PAPAIVIZAS, G. C; COOK, R. J. (eds). **Biological Control of Plant Diseases**: Progress and Challenges for the Future, New York: Plenum Press, 1991. p. 125-132.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts, **Nature Reviews**. v. 2, p. 43-56, 2004.

HARMAN, G. E. et al. Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. **Biological Control**, v. 7, p. 259–266, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **IBGE Cidades**. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 04 ago. 2011.

KÖHL, J. et al. Competitive ability of the antagonists *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* at temperatures favourable for *Botrytis* spp. development. **Biocontrol**, v. 44, p. 329-346, 1999.

KÖHL, J.; FOKKEMA, N. J. Fungal interactions on living and necrotic leaves. In: BLAKEMAN, J. P.; WILLIAMSON, B. (eds). **Ecology of Plant Pathogens**, Wallingford: CABI, 1993. p. 321-334.

KRAUSS, U. et al. Strain discrimination by fungal antagonists of *Colletotrichum musae*: implications for biocontrol of crown rot of banana. **Mycological Research**, v. 105, p. 67–76, 2001.

KRETZSCHMAR, A. A. Controle biológico de patógenos que ocorrem em pós-colheita. In.: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1991. p. 53-69.

LOPES, C. A. **Biological control of *Pseudomonas avenae* with epiphytic bacteria isolated from corn plants**. 1986. 103 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – University of Florida, Florida, 1986.

MANGIAROTTI, A. M. et al. Fungi on phylloplane of treated and not treated vineyard. **Rivista di Patologia Vegetale**, v. 23, n. 1, p. 27-37, 1987.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. v. 1, 264 p.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patógenos de Plantas**, v. 4, p. 261-295, 1996.

MENEZES, J. P. **Caracterização populacional e molecular, e seleção de *Trichoderma* spp. para biocontrole de *Fusarium* sp. em crisântemo.** 2007. 112 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

MORANDI, A. B. et al. Influence of the application time on the establishment, survival, and ability of *Clonostachys rosea* to suppress *Botrytis cinerea* sporulation on rose debris. **Crop Protection**, v. 27, p. 77-83, 2008.

MORANDI, A. B. et al. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in *Botrytis blight* management in commercial greenhouse. **Biological Control**, v. 26, p. 311–317, 2003.

MORETINI, A.; MELO, I. S. Formulação do fungo *Coniothyrium minitans* para controle do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 155-161, 2007.

MUÑOZ, G. et al. Genetic characterisation of *Botrytis cinerea* populations in Chile. **Mycological Research**, v. 106, p. 594–601, 2002.

NELSON, M. E.; POWELSON, M. L. Biological control of gray mold of snap beans by *Trichoderma hamatum*. **Plant Disease**, v. 72, p. 727-729, 1988.

NEWHOOK, F. J. The relationship of saprophytic antagonism to control of *Botrytis cinerea* Pers. on tomatoes. **New Zealand Journal of Science and Technology**, v. 38, p. 473-481, 1957.

NEWHOOK, F. J. Microbiological control of *Botrytis cinerea* Pers. II Antagonism by fungi and actinomycetes. **Annals of Applied Biology**, v. 35, p. 185-202, 1951.

NOBRE, S. A. M. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, v. 34, p. 132-143, 2005.

O'NEILL, T. M. et al. Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v. 81, p. 36–40, 1997.

ORTIZ, A.; ORDUZ, S. *In vitro* evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Attacephalotes*. **Mycopathologia**, v. 150, p. 53–60, 2001.

PAL, K. K.; McSPADDEN GARDENER, B. Biological control of plant pathogens. **The Plant Health Instructor**. Ohio [s.n.], 2006. 25 p.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potencial for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 23, p. 23–54, 1985.

RASPOR, P. et al. Biocontrol of *B. cinerea* with wine yeasts. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 3, p. 336–343, 2010.

RIBÉREAU-GAYON, J. et al. *Botrytis cinerea* in Enology. In: COLEY-SMITH, J. R. et al. (eds). **The Biology of Botrytis**, London: Academic Press, 1980. p. 251-274.

RIDOUT, C. J.; COLEY-SMITH, J. R.; LYNCH, J. M. Fractination of extracellular enzymes from mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 180-187, 1988.

RODRIGUES, J. *Trichoderma* spp. associado a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum*-feijoeiro. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

SANFORD, G. B.; BROADFOOT, W. C. A note on the biological control of root rots of cereals. **Scientia Agricola**, v. 11 p. 460,1931.

SANFORD, G. B. Some factors affecting the pathogenicity of *Actinomyces scabies*. **Phytopathology**, v. 16, p. 525-547, 1926.

SCHER, F. M; CASTAGNO, J. R. Biocontrol: A view from industry. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 8, p. 222-224, 1986.

SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. **Biological Control**, v. 50, p. 205-221, 2009.

SHEN, D. Microbial diversity and application of microbial products for agricultural purposes in China. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 62, p. 237-245, 1997.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. (eds). **Agrotóxicos e Ambiente**. Brasília: EMBRAPA, 2004. 400 p.

SÔNEGO, O.; GARRIDO, L. R.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Doenças fúngicas. In: FAJARDO, T. V. M. (ed). **Uva Para Processamento**: Fitossanidade. Brasília: EMBRAPA, 2003. cap. 2, p. 11-44.

SUDO, S. Biocontrole de *Catacauma torrendiella* e *Coccostroma palmicola*, agentes causadores da lixa preta no coqueiro. Reunião **Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças em Plantas 3**, 1989. Piracicaba, p. 51-59.

SUTTON, J. C. et al. *Gliocladium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, v. 81, p. 316–328, 1997.

TATAGIBA, J. S. et al. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). **Phytoparasitica**, v. 26, p. 8–19, 1998.

TRONSMO, A. Biological and integrated controls of *Botrytis cinerea* on apple with *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**, v. 1, p. 59–62, 1991.

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

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Possibilidades do controle biológico de Phytophthora em macieira. In: BETTIOL, W. (ed). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1991. p. 303-305.

VERMA, M. et al. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 1-20, 2007.

WILSON, C. L., PUSEY, P. L. Potential for biological control of postharvest plant diseases. **Plant Disease**, v. 69, p. 375-378, 1985.

WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 27, p. 425–441, 1989.

WOOD, R. K. S. The control of diseases of lettuce by use of antagonistic microorganisms I The control of *Botrytis cinerea* Pers. **Annals of Applied Biology**, v.38, p.203-216, 1951.

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

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

ZONTA, E. P., MACHADO, A. A. SANEST – **Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Registrado na SEI – Secretaria Especial de Informática, sob n. 066,060, Categoria A. Pelotas, 1984.

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea* COM *Trichoderma* spp. NA PÓS-COLHEITA DE UVAS DE MESA

2.1 Introdução

A preocupação de consumidores com a presença de resíduos de fungicidas em alimentos e de produtores agrícolas com o aumento da resistência de patógenos ao controle químico, assim como também, o aumento da consciência ambiental da população em geral são algumas das principais razões que reforçam cada vez mais o interesse à adoção de alternativas mais ecológicas, como o controle biológico, para a diminuição do impacto de doenças em plantas cultivadas.

O *controle biológico* ou o *biocontrole* de doenças em plantas caracteriza-se através do emprego de microrganismos naturais que apresentam ação antagonista a microrganismos agentes fitopatogênicos. Existem os mais diversos conceitos para esse termo, sendo considerado o controle de um microrganismo através de outro, uma definição simples e direta, e, portanto, aceita na Fitopatologia. Contudo, Cook e Backer (1983) redefiniram e adequaram o termo para que se tivesse maiores embasamentos futuros em estudos científicos e aplicações práticas, servindo atualmente como um grande referencial; assim, o biocontrole é definido como: “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem”.

No que se refere à ação e à atuação do biocontrole, este lança mão das interações biológicas intrínsecas entre antagonista, patógeno e hospedeiro, ao invés de simplesmente representar mais uma forma de controle biocida. Nesse sentido, o controle biológico contextualiza a doença além de um triângulo interativo entre patógeno e hospedeiro, influenciados pelo ambiente. Sob tal contexto, “doença” passa a ser o resultado de uma ação recíproca que limita o potencial patogênico, pois, sob as mesmas condições, o sítio de infecção na planta também pode ser habitado por diversos agentes antagonistas, os quais, de forma alternativa, podem induzir à ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro (COOK, 1985). Nessa relação, os integrantes do controle biológico passam a ser, então, o patógeno, o

hospedeiro e os antagonistas (*BCAs*); todos interagindo dentro de um sistema, influenciados pelo ambiente.

A informação completa dos mecanismos envolvidos na interação *planta x patógeno x BCA* e os demais microrganismos epífitos residentes nos tecidos vegetais (Figura 13), dentro do sistema controle biológico, não é, todavia, conhecida para a grande maioria dos patossistemas até o presente estudados. Sabe-se, contudo, que mecanismos de ação dos antagonistas estão envolvidos na interação. Evidentemente, esse processo não ocorre apenas no campo, mas também em ambientes com áreas mais limitadas, como em câmaras frias de armazenamento pós-colheita ou sob temperaturas mais amenas, como em prateleiras de supermercados. Embora a competição por nutrientes pareça ser a atividade mais importante desempenhada pelos antagonistas no armazenamento pós-colheita, é pouco provável, porém, a partir dessa suspeita, que apenas um mecanismo de ação esteja envolvido na supressão de uma doença (DROBY et al., 2000; JANISIEWICZ et al., 2000).

Na biossupressão de uma doença, o agente de controle mais bem sucedido é aquele que lança mão de todos os seus meios e atributos para a colonização do patógeno. A figura 13 ilustra esquematicamente como essas interações entre os três organismos podem estar ocorrendo em um determinado patossistema. As incertezas remanescentes são aquelas que dizem respeito, principalmente, às respostas do patógeno e do hospedeiro ao *BCA*. O desempenho de um *BCA* pode ser medido pelo resultado desse complexo de interações. Na interação entre antagonista e patógeno, Wisniewski et al. (1991) foram um dos primeiros pesquisadores a relatar a habilidade de leveduras em aderir e parasitar hifas de fungos superiores. A produção de enzimas líticas por leveduras antagonistas também foi outro elemento-chave importante descoberto e posteriormente relatado por vários trabalhos de biocontrole de fungos fitopatogênicos incidentes durante o armazenamento pós-colheita de produtos vegetais, como hortaliças e frutas (FRIEL et al., 2007; BAR-SHIMON et al., 2004).

Na pós-colheita, portanto, há pelo menos duas décadas, pesquisas envolvendo controle de podridões têm evoluído dentro de um sistema de produção integrada, aumentando-se cada vez mais a adesão ao controle biológico numa escala mais industrial (DROBY et al., 2009). Nessa etapa da produção, as perdas se devem muito à ação deteriorante de fungos e bactérias. Essas perdas são

De acordo com Wilson e Pusey (1985), uma das maiores dificuldades do emprego de microrganismos no controle de doenças é a impossibilidade de controlar as condições ambientais. São bastante comuns exemplos de antagonistas bem sucedidos em laboratório e em ambientes controlados, que fracassam quando submetidos ao ambiente natural, com baixa umidade e presença de raios ultravioleta, e como frutas normalmente estão armazenadas sob condições controladas de temperatura e umidade relativa, os autores relacionam três fatores que indicam o controle biológico ser viável e passível de exploração na pós-colheita, como: a) *controle das condições ambientais*, b) *limitação da superfície de aplicação dos antagonistas* e c) *economicamente praticável sob condições de armazenamento*.

Alguns trabalhos podem ser citados como exemplos do emprego de BCAs no controle de doenças de pós-colheita, como o de Tronsmo e Dennis (1974), que obteve redução na incidência de podridões de *B. cinerea* em morangos durante o armazenamento e na pré-colheita, através da pulverização de *Trichoderma* a partir do primeiro estágio floral, em intervalos de 14 dias. O antagonista proporcionou um bom controle mesmo quando comparado ao tratamento químico com diclofluanida. Wilson e Pusey (1984) verificaram, também, um significativo controle da podridão parda (*Monilinia fructicola*) em pêsego, nectarina, damasco e ameixa com o emprego de *Bacillus subtilis*.

Na produção de uvas de mesa, mais de dois milhões de toneladas são transportadas anualmente de países do hemisfério sul para países do hemisfério norte e em menor quantidade, por outras rotas (DROBY; LICHTER, 2007). Excedentes de produção acumulados durante os picos de colheita são armazenados para o consumo local, com uma oferta temporária para o consumidor. A safra pode ser estendida substancialmente pelo correto planejamento do vinhedo compondo-o com variedades precoces e tardias e pela diversificação das áreas. O transporte e o armazenamento de uvas requerem desenvolvimento de tecnologias comerciais que provenham à conservação do produto de maneira que não ocorram danos, além de manter a aparência e o sabor. O maior desafio encontrado para uma maior eficiência de emprego dessas tecnologias na pós-colheita de uvas é, portanto, a podridão-cinzenta causada por *B. cinerea*.

Muitos são os meios encontrados por *B. cinerea* para o estabelecimento de infecções em cachos durante o armazenamento. O patógeno pode incidir na floração

e no aparecimento das primeiras bagas, resultando em infecções latentes. A real contribuição desse meio de infecção, posteriormente no armazenamento dos frutos, pode ser insignificante caso medidas de controle preventivo sejam tomadas, como a remoção de inóculo externo e a desinfecção da superfície dos cachos, as podem prevenir danos de maior escala (LICHTER et al., 2002). Durante a maturação dos cachos, a suscetibilidade aumenta já que a concentração de fitoalexinas, como o resveratrol, diminui (JEANDER et al., 1991). Em variedades de uvas com bagas de coloração mais escura, a incidência da podridão-cinzenta pode ser menor, já que há uma maior concentração de compostos fenólicos responsáveis também pela defesa a doenças (SÔNEGO et al., 2003). Pássaros, insetos e os próprios danos mecânicos provocador pelo produtor juntamente com rachaduras provocadas pelo excesso de calor e/ou excesso de umidade podem ser novos vetores e novos caminhos para futuras infecções (COERTZE; HOLZ, 2002; BROOME et al., 1995). Contudo, em climas subtropicais, a podridão-cinzenta é menos frequente e a infecção durante o armazenamento constitui-se no principal problema. O primeiro sintoma durante o armazenamento é denominado de *slip-skin*, ou seja, separação da casca e da polpa em contato. Usualmente esse dano fisiológico é acompanhado por uma coloração vermelha-amarronzada facilmente percebida em variedades de casca branca. A podridão-cinzenta é especialmente problemática devido ao seu rápido e vigoroso crescimento na ráquis do cacho e na superfície das bagas e de sua grande habilidade de dispersão entre as bagas mesmo em baixas temperaturas, podendo ser inferiores a -0.5°C (CAPPELLINI et al., 1986). As infecções que originam as perdas pós-colheita podem originar-se de esporos na superfície de bagas; de infecções microscópicas latentes que se originam no campo antes mesmo da colheita dos cachos, durante os períodos de crescimento da vinha; ou durante a colheita quando bagas infectadas com as doenças deixam de ser removidas (DE KOCK; HOLZ, 1994).

Para prolongar o tempo de armazenamento de uvas recomenda-se adotar o pré-resfriamento a $4-5^{\circ}\text{C}$, logo após a colheita e depois mantê-las à temperatura de 0°C e 90-95% UR (NELSON, 1979). No entanto o uso do frio não é o suficiente para controlar a doença e, para o mercado interno, pouco se utiliza a cadeia de frio. A vida útil de prateleira, também precisa ser levada em consideração, ressaltando-se os aspectos básicos da durabilidade do produto ofertado ao consumidor. Dentre os métodos de controle de podridões em uva pós-colheita, destaca-se o uso de SO_2 ,

praticado já há muitas décadas visando principalmente *B. cinerea*. Esse produto pode ser aplicado nas uvas por fumigação em câmaras fechadas ou como sachês de metabisulfito de sódio ou de potássio no interior das embalagens, que com a umidade passam a liberar SO₂ (SÖYLEMEZOGLU; AGAOGLU, 1994).

O controle biológico de *B. cinerea* através do emprego de BCAs em frutas, hortaliças e flores mostra efeitos benéficos quando aplicado na pós-colheita dessas *commodities* vegetais (ELMER; REGLINSKI, 2006). Em uvas, por exemplo, têm-se obtido resultados satisfatórios com o emprego de leveduras e bactérias (RASPOR et al., 2010; BENATO et al., 1998). Na produção de uvas, em geral, quando se opta por esse tipo de controle, outras espécies de BCAs, principalmente fungos do gênero *Trichoderma*, são aplicados como tratamento preventivo nos parreirais durante a floração e a maturação de cachos. Não se tem, porém, uma avaliação clara sobre a eficiência do biocontrole desses agentes na incidência do patógeno durante o armazenamento pós-colheita.

Sabendo-se, portanto, do potencial de *Trichoderma* como agente antagonista, assume-se que esse microrganismo é capaz de exercer um bom controle sobre *Botrytis cinerea* na pós-colheita de uvas, da mesma forma que mostrou, no trabalho anterior, boas médias de atividade de biocontrole *in vitro*. Sob essa hipótese, o objetivo do presente estudo foi verificar a eficiência de controle semi *in vivo* de isolados antagonistas de *Trichoderma* spp. sobre isolados de *B. cinerea* oriundos das duas principais regiões vitícolas do Rio Grande do Sul (serra e campanha meridional) na pós-colheita, principalmente durante a vida útil de prateleira, de uvas de mesa de variedades comuns.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Material fúngico e vegetal

Os isolados de *B. cinerea* avaliados neste estudo foram os mesmos do estudo anterior (*Antagonismo in vitro entre isolados de Botrytis cinerea e fungos biocontroladores*), já os isolados antagonistas foram utilizados somente aqueles que

obtiveram o melhor desempenho na atividade de biocontrole no estudo anterior (UFSM TSG, UFSM TCM e UFSM T15.1), todos do gênero *Trichoderma*.

Foram testadas as cultivares 'Niágara Branca' e 'Niágara Rosada', ambas de mesa comum (*Vitis labrusca* L.), as quais foram aqui denominadas, de forma a facilitar o entendimento deste estudo, de *uvas brancas* e *uvas tintas*, respectivamente. O material foi colhido em parreirais da serra gaúcha na safra de 2010/2011. Anterior à instalação dos ensaios, os cachos estiveram armazenados sob atmosfera controlada a $5,0\pm 0,5$ °C e umidade relativa (UR) de $90\pm 1\%$.

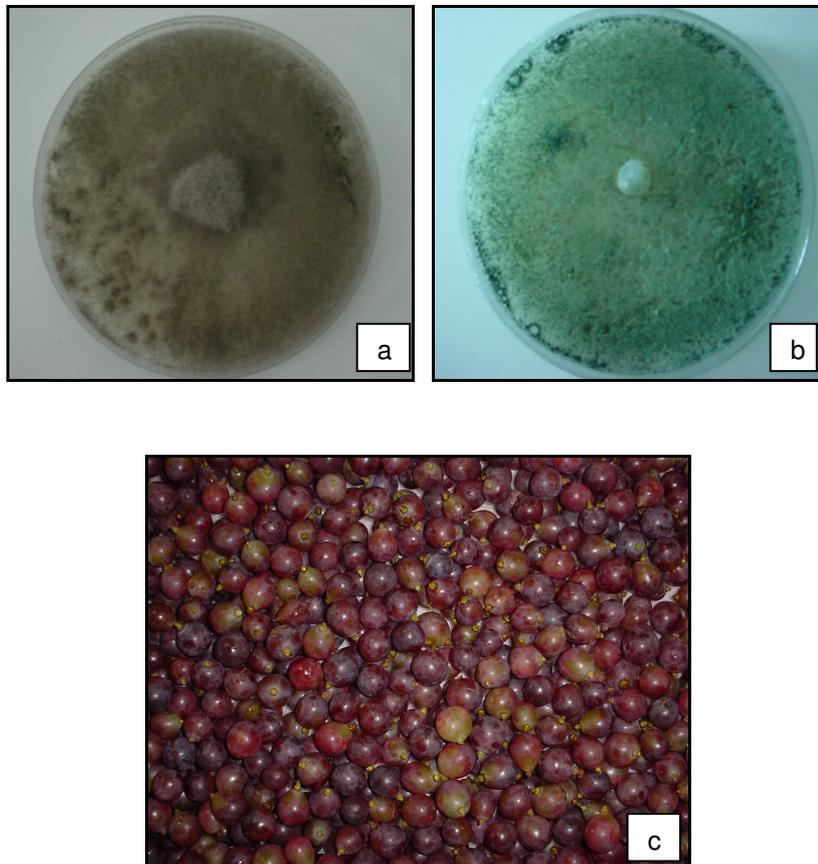


Figura 14 – Exemplificação do material fúngico, a) isolados de *Botrytis cinerea* e b) isolados de *Trichoderma* sp., e do material vegetal, c) bagas de uvas (na foto – tintas), empregados no estudo. Santa Maria, RS, 2011.
Fotos: Hamann, 2011.

2.2.2 Local

Conduziu-se o experimento no Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi do Departamento de Defesa Fitossanitária (DFS), localizado no Centro de Ciências Rurais (CCR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul, no período de janeiro a março de 2011.

2.2.3 Instalação do experimento

O experimento foi instalado em duas etapas. Na primeira montou-se o ensaio com as uvas brancas e na segunda com as uvas tintas, todos os procedimentos, a seguir descritos, foram realizados para ambas as cultivares. Avaliaram-se as respostas às suspensões de esporos de *B. cinerea* (10^5 conídios.mL⁻¹) e *Trichoderma* (10^6 conídios.mL⁻¹) em diferentes períodos, aplicadas por pulverização na superfície das bagas destacadas. Foram avaliadas três formas de inoculação: *B+T*, aplicação das suspensões ao mesmo tempo; *B+24hT*, primeiramente aplicaram-se as suspensões dos isolados patogênicos e 24 h depois as dos isolados antagonistas; e por último, *T+24hB*, em que foram aplicadas as suspensões antagonistas no primeiro dia e as patogênicas no segundo dia.

Foram escolhidas somente bagas sadias sem nenhuma deformação ou com algum tipo de dano fisiológico ou sintoma de doença. Não foi dado nenhum tratamento fitossanitário químico prévio, como aplicação de fungicida, mas foi realizada uma assepsia do material. As bagas foram cuidadosamente destacadas dos cachos, permanecendo aproximadamente 10 mm de pedicelo a partir da inserção no fruto, evitando-se com isso a perda de água e a deterioração por outros agentes patogênicos durante a condução do experimento. Após a degreana foi feita a assepsia do material, submergindo-se as bagas em uma solução de hipoclorito de sódio a 2%, durante 2 minutos, e, em seguida as mesmas foram submersas em água destilada para, posteriormente, serem secas sobre folhas de papel filtro em temperatura ambiente.

Após a secagem, as bagas foram colocadas em caixas do tipo “gerbox” em número de 10 por repetição, totalizando 3 repetições, num total de 15 tratamentos para cada período de inoculação (*B+T*, *B+24hT* e *T+24hB*), e 9 controles, uma

testemunha absoluta (T0) e 8 controles sem combinação de suspensões. As combinações de suspensões de inóculo foram: *SG01 x TSG*, *SG01 x TCM*, *SG01 x T15.1*, *SG02 x TSG*, *SG02 x TCM*, *SG02 x T15.1*, *SG03 x TSG*, *SG03 x TCM*, *SG03 x T15.1*, *CM01 x TSG*, *CM01 x TCM*, *CM01 x T15.1*, *CM02 x TSG*, *CM02 x TCM* e *CM02 x T15.1* (considera-se a codificação de todos os isolados com a sigla inicial UFSM, a qual foi ocultada neste capítulo, apenas para facilitar a compreensão). As suspensões foram aplicadas com a ajuda de um borrifador comum, usado na irrigação de plantas ornamentais. Foram aplicados aproximadamente 6 mL de suspensão para cada tratamento em todas as unidades experimentais, a uma distância de 20 cm, umedecendo, completamente, o papel filtro colado no fundo de cada *Gerbox*. Para a testemunha absoluta (T0) aplicou-se somente 6 mL de água destilada e esterilizada por repetição e para os demais controles, completou-se com água destilada e esterilizada o volume remanescente após a aplicação das suspensões sem combinação.

O material foi, em seguida, transferido para *BODs*, permanecendo ali sob temperatura constante de $20\pm 1^\circ\text{C}$ por sete dias, tempo considerado como vida útil de prateleira a temperatura ambiente.

2.2.4 Análise dos dados

Os dados foram submetidos a uma escala de notas pré-estabelecida, que permitiu avaliar não somente danos causados por *B. cinerea*, mas também permitiu englobar todos os danos de natureza fisiológica. As notas foram de 0 a 5, cada uma indicando as seguintes características: 0 – *bagas saudias*, 1 – *bagas escurecidas*, 2 – *bagas com rachaduras*, 3 – *bagas escurecidas e com rachaduras*, 4 – *bagas com sintomas*, 5 – *bagas escurecidas, com rachaduras e com sintomas*. Em seguida, o grau de dano foi calculado aplicando-se a fórmula proposta por Raspor et al. (2010):

$$\text{Grau de dano (\%)} = [\Sigma(n \times v) / ixN] \cdot 100 \quad (2)$$

Em que,

n – número de bagas com a mesma nota, dentro da mesma repetição;

v – valor da nota;

i – valor da maior nota;

N – número total de bagas por repetição.

Os valores obtidos, após a aplicação da fórmula, deram uma dimensão da percentagem de bagas com danos em uma determinada nota dentro da escala, possibilitando a avaliação dos tratamentos aplicados. O efeito benéfico de *Trichoderma* foi assumido através dos resultados dos tratamentos que não apresentaram danos do patógeno (notas 0, 1, 2 e 3). Em seguida, os dados foram submetidos à ANOVA e ao teste de médias, utilizando-se o teste Tukey a 5% de probabilidade de erro. Os dados obtidos em todas as variáveis (notas da escala) foram transformados pela equação $\sqrt{x+0,5}$ para o teste de normalidade. Os dados foram analisados como trifatorial em duas análises, na primeira avaliando-se a interação entre os isolados de *B. cinerea*, de *Trichoderma* e as duas cultivares de uva (5x3x2), para cada um dos períodos de inoculação. Na segunda análise, avaliou-se a interação entre os isolados de *B. cinerea* e *Trichoderma* e os três períodos de inoculação (5x3x3), para cada cultivar de uva testada. Empregaram-se como ferramentas estatísticas os *softwares* SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2010) e Microsoft Excel 2007.

2.3 Resultados e discussão

Diferentes valores médios de grau de dano (G.D.) puderam ser observados. Evidenciou-se claramente, também, que cultivares de uva de mesa comum, apesar da maior rusticidade e resistência à podridão-cinzenta, podem ser suscetíveis, sob condições favoráveis, ao ataque de *B. cinerea*. Em algumas amostras pôde ser observada a presença de micélio do antagonista associado com o micélio do patógeno (Figura 15), demonstrando, possivelmente, a ação antagonista do primeiro sobre o segundo (DROBY et al., 2009).



Figura 15 – Aparecimento de micélio de *Trichoderma* (coloração verde) na lesão, em meio ao micélio de *B. cinerea* (coloração cinza), em bagas de uva com rachaduras, cultivar 'Niágara Branca'. Nesse entrelaçamento de micélios, possivelmente, está sendo exercida a ação parasitária do antagonista sobre o patógeno. Santa Maria, RS, 2011.
Foto – Hamann, 2011.

Houve diferenças de controle entre os antagonistas oriundos de cachos de uva (TSG e TCM) e do solo (T15.1), variando de acordo com os fatores avaliados. Microrganismos *BCAs* oriundos de nichos ecológicos diferentes do nicho de infecção do fitopatógeno são, muitas vezes, desejáveis, pois essa característica diferencial, obtida através de inúmeros agentes antagonistas, provê vantagens importantes no biocontrole, principalmente devido ao encurtamento do processo de seleção desses agentes, podendo-se, dessa maneira, obter um resultado de biossupressão igual ou até mesmo superior ao controle biológico de doenças por meio do emprego de agentes oriundos do mesmo nicho de infecção do patógeno, ou seja, do mesmo hospedeiro, do mesmo órgão no hospedeiro ou da mesma espécie de hospedeiro. Baseado nisso, Baker et al. (1985) verificaram a eficiência de antagonistas oriundos do solo para controlar a ferrugem da folha do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Os autores obtiveram uma redução de 95% de pústulas de *Uromyces appendiculatus* (Pers.) após a aplicação de cultura líquida de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn na parte aérea de plantas em casa de vegetação.

O antagonismo entre patógeno e *BCA* oriundos de nichos ecológicos diferentes, porém, nem sempre ocorre. A exemplo disso, Harman et al. (1996), estudando o biocontrole de *B. cinerea* em videira, durante o período de floração, não

obtiveram resultados expressivos com o emprego de um isolado antagonista de *Trichoderma virens* oriundo do solo. Sob determinadas condições, muitos microrganismos, com suposta ação antagonista, podem não apresentar um bom desempenho quando introduzidos em superfícies e ambientes muito diferentes dos seus ambientes de origem, podendo a expressão de características antibióticas, por razões de adaptabilidade do biocontrolador ou por alguma deficiência nutritiva sofrida pelo mesmo, não ocorrer.

Com relação aos valores médios de grau de dano obtidos nos diferentes períodos de inoculação, observou-se que a interação tripla entre os tratamentos foi significativa para a maioria das notas. A significância pôde ser observada nos três períodos de inoculação avaliados. Para *B+T* houve significância para os tratamentos aplicados na expressão das notas 2, 3, 4 e 5, para *T+24hB* houve significância para as notas 2, 4 e 5 e para *B+24hT* os tratamentos foram significativos somente na expressão da nota 3, ou seja, para bagas escurecidas e com rachaduras.

Em *B+T* houve interação tripla (*B. cinerea* x *Trichoderma* x cultivar de uva) para as notas 2 e 5 (Tabelas 8 e 9). No desdobramento dessa interação observou-se que o aparecimento de sintomas (nota 5) teve correlação positiva com a ocorrência de rachaduras (nota 2). Correlação essa que não pôde ser observada para o fator coloração de bagas, já que a maior ocorrência de sintomas nas uvas tintas em comparação com as brancas, neste trabalho, teve fundamentalmente maior influência do expressivo número de bagas rachadas na cultivar 'Niágara Rosada' em comparação à cultivar 'Niágara Branca', apesar das cultivares tintas, comumente, serem mais resistentes ao fungo (SÔNEGO et al., 2003).

Na variável nota 2 (bagas rachadas), a suspensão de T15.1 aplicada sobre bagas tintas mostrou diferenças na ocorrência de rachaduras de acordo com os diferentes isolados de *B. cinerea*. Dessa forma, um isolado do patógeno da campanha (CM 01) e outro da serra (SG 03) apresentaram valores semelhantes na percentagem de rachaduras, 5,33 e 4,00%, respectivamente (Tabela 8), presumindo-se, portanto, que a infecção e a colonização por *B. cinerea* pode ter sido comprometida pela ação do isolado de *Trichoderma* (T15.1), apesar da ocorrência de rachaduras. Nessa avaliação, observou-se também que a expressão da nota não contribuiu para classificação dos mesmos segundo o local o seu local de origem.

Tabela 08 – Médias de grau de dano (G. D.) (%) na expressão da nota 2 (bagas rachadas) em uvas de mesa brancas e tintas, cultivares ‘Niágara Branca’ e ‘Niágara Rosada’, respectivamente, inoculadas com isolados do patógeno *B. cinerea* e do antagonista *Trichoderma* no período de inoculação *B+T* (inoculação simultânea de patógeno e antagonista). Santa Maria, RS, 2011.

| <i>B. cinerea</i> x <i>Trichoderma</i> x Uva | | | | | | | | | |
|---|--------|---|--------|--|--------|---------------|--------|-------------|--------|
| <i>B. cinerea</i> (<i>Trichoderma</i> x Uva) | | <i>Trichoderma</i> (<i>B. cinerea</i> x Uva) | | Uva (<i>B. cinerea</i> x <i>Trichoderma</i>) | | | | | |
| T15.1 x Tinta | | CM 01 x Branca | | CM 01 x T15.1 | | SG 03 x T15.1 | | SG 03 x TCM | |
| CM 01 | 5,33 a | | | | | | | | |
| | | TSG | 4,67 a | | | | | | |
| SG 03 | 4,00 a | | | Tinta | 5,33 a | Tinta | 4,00 a | Branca | 4,00 a |
| | | T15.1 | 0,00 b | | | | | | |
| CM 02 | 0,00 b | | | | | | | | |
| SG 02 | 0,00 b | | | Branca | 0,00 b | Branca | 0,00 b | Tinta | 0,00 b |
| | | TCM | 0,00 b | | | | | | |
| SG 01 | 0,00 b | | | | | | | | |

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si (Scott-Knott $P \leq 0,05$). Dados originais foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$, para análise estatística.

Tabela 09 – Médias de grau de dano (%) na expressão da nota 5 (bagas rachadas e com sintomas de *B. cinerea*) em uvas de mesa brancas e tintas, cultivares ‘Niágara Branca’ e ‘Niágara Rosada’, respectivamente, inoculadas com isolados do patógeno *B. cinerea* e do antagonista *Trichoderma* no período de inoculação *B+T* (inoculação simultânea de patógeno e antagonista). Santa Maria, RS, 2011.

| <i>B. cinerea</i> x <i>Trichoderma</i> x Uva | | | | | | | |
|--|---------|-------------|---------|---|---------|---------------|---------|
| <i>B. cinerea</i> (<i>Trichoderma</i> x Uva) | | | | <i>Trichoderma</i> (<i>B. cinerea</i> x Uva) | | | |
| TCM x Tinta | | TSG x Tinta | | CM 02 x Tinta | | SG 03 x Tinta | |
| CM 01 | 26,67 a | SG 03 | 36,67 a | TCM | 16,67 a | TSG | 36,67 a |
| CM 02 | 16,67 a | CM 01 | 26,67 a | | | | |
| SG 01 | 0,00 b | CM 02 | 3,33 b | TSG | 3,33 b | T15.1 | 6,67 b |
| SG 02 | 0,00 b | SG 02 | 3,33 b | | | | |
| SG 03 | 0,00 b | SG 01 | 3,33 b | T15.1 | 0,00 b | TCM | 0,00 b |
| Uva (<i>B. cinerea</i> x <i>Trichoderma</i>) | | | | | | | |
| CM 01x TCM | | CM 01 x TSG | | SG 03 x TSG | | | |
| Tinta | 26,67 a | Tinta | 26,67 a | Tinta | 36,67 a | | |
| Branca | 0,00 b | Branca | 0,00 b | Branca | 0,00 b | | |

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si (Scott-Knott $P \leq 0,05$). Dados originais foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$, para análise estatística.

Contudo, de forma geral, a ocorrência de rachaduras é fator fundamental na infecção de bagas de uva por *B. cinerea*. Nesse sentido, Coertze e Holz (2002) descreveram a ação de conídios recém liberados de conidióforos maduros e em seguida depositados, com a ação do vento, sobre a superfície de cachos e de conídios latentes depositados sobre cachos com bagas sem fermentos, estes sendo feitos, no entanto, propositalmente, 96 horas após a inoculação. Uvas colhidas em dois períodos de maturação, início e fim, e uvas totalmente maduras previamente armazenadas sob atmosfera controlada (câmara fria), as quais representam respectivamente alta resistência e alta suscetibilidade à infecção e manifestação dos sintomas de podridão-cinzenta (COERTZE et al., 2001; COERTZE; HOLZ, 1999), foram incluídas nesse estudo. No caso em que as bagas foram inoculadas durante o início e o fim da maturação, os conídios não infectaram os cachos com os fermentos feitos 96 horas após a deposição dessas unidades infectivas. Os resultados encontrados pelos autores indicam que a adesão de conídios e a formação de tubo germinativo na superfície das bagas podem tornar-se inviáveis quando não existirem aberturas, naturais ou ferimentos, que possibilitem a entrada do tubo germinativo e a consequente colonização do corpo do hospedeiro. A deposição de conídios em aberturas naturais ou ferimentos já pré-existentes é uma das principais vias de infecção do patógeno, que, para tal, também necessita de água livre, a qual tem um papel fundamental, muitas vezes mais importante que os altos teores de umidade ou de exsudatos vegetais para que a infecção ocorra com sucesso. Quase metade das bagas avaliadas pelos autores, no entanto, não produziram exsudatos. Estes, quando produzidos, foram observados com maior frequência na extremidade mais afilada da baga, ou seja, na inserção da ráquis. Neste presente trabalho, a ocorrência natural de rachaduras deu-se principalmente no segundo ou no terceiro dia de incubação, período em que a suspensão de esporos aplicada ainda encontra conídios viáveis para garantir a infecção consequente. A umidade adequada das unidades experimentais também foi outro aspecto fundamental que garantiu a existência de água livre para a ocorrência das infecções.

Vários estudos têm associado, também, a ocorrência de rachaduras na pós-colheita a fenômenos climáticos no campo durante a maturação e colheita dos cachos. Considerando o excesso de chuvas como um dos principais fatores, presume-se que o mesmo, neste trabalho, tenha sido também um dos principais responsáveis pela ruptura da epiderme das bagas, mesmo essa ocorrendo mais

tardiamente no armazenamento pós-colheita, como resultado do aumento de turgor das células (DEMIRSOY; DEMIRSOY, 2004). Durante a fase produtiva nos vinhedos, houve um bom suprimento de água, não faltando chuvas durante a maturação dos cachos empregados neste presente estudo. Levando-se em consideração, ao mesmo tempo, as características morfológicas da epiderme, Demirsoy e Demirsoy (2004) fizeram um estudo baseado no rompimento da casca em cerejas, morfológicamente semelhantes às bagas de uva, não encontrando, porém, uma correlação positiva entre a espessura da cutícula e a ocorrência de rachaduras.

No período $T+24hB$, para a nota 5, observaram-se resultados significativos na interação $AxBxD$ (Tabela 10). Na combinação desses fatores pôde ser evidenciado que os isolados patogênicos coletados na serra gaúcha (SG 02 e SG 03) apresentaram as maiores médias de G. D em bagas com rachaduras, expressando, portanto, a nota 5. Comparando-os com o isolado antagonista oriundo dessa mesma região, constatou-se que as unidades experimentais inoculadas com TSG não demonstraram bons resultados de biocontrole, obtendo-se uma média de 23,33% de grau de dano, seguido por T15.1, com 13,33%. Nesse caso, o isolado oriundo da campanha meridional (TCM) compreendeu as unidades com menor incidência de sintomas. O dano classificado como nota 5 ocorreu apenas em uvas tintas, não verificando-se o mesmo em uvas brancas, tanto para o período $B+T$, quanto para o período $T+24hB$.

As uvas brancas, em geral, apresentaram menores danos fisiológicos provocados por rachaduras (Figura 16), conseqüentemente, nessas, a incidência da nota 5 foi menor. Os maiores danos nas uvas brancas foram obtidos no período $B+24hT$, e nas uvas tintas no período $B+T$, com 5,78 e 9,33%, (Tabela 12), respectivamente. Constatou-se através desses resultados que a inoculação de BCAs anterior a contaminação do patógeno é uma medida eficiente, a qual tem as maiores chances de sucesso caso, em determinado sistema de produção, o controle biológico for adotado.

Tabela 10 –Grau de dano (%) na expressão da nota 5 (bagas rachadas e com sintomas de *B. cinerea*) em uvas de mesa brancas e tintas, cultivares ‘Niágara Branca’ e ‘Niágara Rosada’, respectivamente, inoculadas com isolados do patógeno *B. cinerea* e do antagonista *Trichoderma* no período *T+24hB* (inoculação do antagonista 24 horas anteriores à inoculação do patógeno). Santa Maria, RS, 2011.

| <i>B. cinerea</i> x <i>Trichoderma</i> x Uva | | | | | | | |
|---|---------|---------------|---------|---|---------|---------------|---------|
| <i>B. cinerea</i> (<i>Trichoderma</i> x Uva) | | | | <i>Trichoderma</i> (<i>B. cinerea</i> x Uva) | | | |
| T 15.1 x Tinta | | TSG x Tinta | | SG 03 x Tinta | | SG 02 x Tinta | |
| SG 02 | 13,33 a | SG 03 | 23,33 a | TSG | 23,33 a | T15.1 | 13,33 a |
| CM 02 | 0,00 b | CM 02 | 0,00 b | | | | |
| CM 01 | 0,00 b | CM 01 | 0,00 b | T15.1 | 0,00 b | TCM | 10,00 a |
| SG 03 | 0,00 b | SG 02 | 0,00 b | | | | |
| SG 01 | 0,00 b | SG 01 | 0,00 b | TCM | 0,00 b | TSG | 0,00 b |
| <i>Uva</i> (<i>B. cinerea</i> x <i>Trichoderma</i>) | | | | | | | |
| SG 03 x TSG | | SG 02 x T15.1 | | SG 02 x TCM | | | |
| Tinta | 23,33 a | Tinta | 13,33 a | Tinta | 10,00 a | | |
| Branca | 0,00 b | Branca | 0,00 b | Branca | 0,00 b | | |

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si (Scott-Knott $P \leq 0,05$). Dados originais foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$, para análise estatística.

É necessário, porém, fazendo menção, nesse sentido, ao controle preventivo, de uma série de considerações a respeito do modo de ação e, principalmente, da fase de desenvolvimento do agente biocontrolador, que, contrariamente ao tratamento químico, em prol da sua eficiência, enfatiza muito mais as etapas de desenvolvimento do microrganismo do que os estádios de desenvolvimento da cultura hospedeira, uma discussão importante que tem se difundido pelas últimas décadas entre os sistemas de produção agrícola que adotam o controle biológico. Anterior a isso, contudo, por muitos anos, a aplicação de biocontroladores no campo era feita de forma semelhante à aplicação de defensivos químicos (fungicidas), isto é, através de um cronograma de aplicação com intervalos pré-definidos de acordo com o estágio de desenvolvimento da cultura (O'NEIL et al., 1996; ELAD et al., 1993). Anos mais tarde, considerando-se as diferenças entre os tempos de resposta dos dois tratamentos, considerou-se fundamentalmente esse ponto crucial de diferença entre as duas modalidades de controle, concluindo que o controle biológico não era capaz de apresentar um efeito tão imediato quanto o controle químico, passando, por isso, o uso de *BCAs* a ser mais estratégico, atrelado, principalmente, ao período de maior efetividade do microrganismo, o qual compreende o período necessário para o estabelecimento das colônias no substrato vegetal e para a indução à elicitação de moléculas do sistema de defesa do hospedeiro. Elad et al. (1994), no controle de *B. cinerea* em uvas, observaram que a intercalação do tratamento químico e do biológico foi mais efetivo do que a aplicação de *BCAs* exclusivamente, sendo bastante ineficiente, porém, o uso do controle biológico em fases epidemiológicas da doença (SHTIENBERG; ELAD, 1997), ou seja, associado ao presente estudo, a fase que corresponde o estabelecimento e colonização do patógeno, a saber, o período *B+24hT*.

Elad e Stewart (2007) sugerem que o melhor emprego de *BCAs* se dá no armazenamento pós-colheita, no qual há um maior controle dos próprios microrganismos sobre a produção de seus antibióticos, pois a efetividade, devido ao espaço mais manuseável, pode ser maximizada e os riscos de incidência de populações fitopatogênicas podem ser minimizados. Uma estratégia alternativa para o biocontrole na pós-colheita é o uso de microrganismos que, preferencialmente, ocupem ferimentos no corpo vegetal, como exemplo, rachaduras em uvas, evitando, com isso, a entrada de patógenos, como *B. cinerea*, no tecido do hospedeiro. Leveduras antagonistas têm mostrado tais atributos, os quais podem ser conferidos

com o emprego de novos produtos biológicos que têm sido anualmente lançados no mercado (RASPOR et al., 2010). O uso de fungos biocontroladores, como o *Trichoderma*, ainda necessitam de maiores estudos, mas algumas prévias, como a do presente estudo, apontam esse gênero antagonista como uma grande promessa para o controle biológico de podridões na pós-colheita, com a tendência de diminuir-se cada vez mais o emprego do tratamento químico.

Nas notas em que não se consideraram os sintomas de *B. cinerea* (1, 2 e 3), houve diferenças entre os valores obtidos para quase todos os períodos de inoculação do patógeno e do antagonista, o mesmo não ocorreu, no entanto, com a nota 0, a qual abrangeu todas as bagas sadias, sem injúrias e sem sintomas. Sugere-se que pode existir uma pré-disposição das bagas à colonização do fungo devido à ocorrência de injúrias fisiológicas (escurecimento e rachaduras) prévias, pois nas unidades experimentais pôde ser observada uma maior incidência da nota 5 devido à maior incidência das notas 2 e 3, as quais abrangeram bagas com rachaduras e bagas escurecidas com rachaduras, respectivamente. Na nota 1, não houve, porém, efeito significativo sobre os fatores avaliados nos períodos de inoculação *B+T* e *T+24hB*. A média geral nesses dois períodos foi de 2,07 e 2,71%, respectivamente. No período *B+24hT*, a nota 1 teve média geral de 3,13%. Neste, houve efeito sobre os isolados de *B. cinerea* e cor da baga, obtendo-se nas uvas brancas uma maior quantidade de bagas escuras nas unidades experimentais inoculadas com SG 03, CM 01 e CM 02. Nas tintas, para essa mesma nota, houve efeito significativo entre os três fatores, observando-se médias superiores na interação dos isolados SG 03 e CM02 com os antagonistas TCM e T15.1, respectivamente, principalmente no período de inoculação *B+24hT*.

Bagas rachadas e escurecidas (nota 3) também apresentaram diferenças significativas entre os níveis dos fatores avaliados, com interação entre os fatores isolados de *B. cinerea* e cultivares de uva no período em que patógeno e antagonista foram inoculados simultaneamente (*B+T*) (Tabela 11). Na inoculação do antagonista seguida pelo patógeno (*B+24hT*) houve diferenças significativas nas médias obtidas.

Tabela 11 – Médias (%) de danos classificados como nota 3 (escurecimento e rachaduras) em bagas de uvas de mesa tintas e brancas (Niágara Branca e Niágara Rosada) inoculadas com isolados do patógeno *B. cinerea* e do antagonista *Trichoderma* no período de inoculação *B+T*. Santa Maria, RS, 2011.

| | <i>B. cinerea</i> x Uva | | Uva x <i>B. cinerea</i> | | | |
|-------|-------------------------|--|-------------------------|--------|--------|---------|
| | Tinta | | CM 02 | | SG 03 | |
| SG 03 | 12,67 a | | | | | |
| CM 02 | 9,33 a | | Tinta | 9,33 a | Tinta | 12,67 a |
| CM 01 | 6,00 b | | | | | |
| SG 01 | 2,00 b | | Branca | 2,77 b | Branca | 2,00 b |
| SG 02 | 1,33 b | | | | | |

* Média de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si (Scott-Knott $P \leq 0,05$). Dados originais foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$, para análise estatística.

Os sintomas da podridão-cinzenta não foram constatados em todas as unidades experimentais. Houve efeito da cor da baga sobre a ocorrência de sintomas. Não considerando o efeito das rachaduras, as bagas de coloração branca apresentaram as maiores médias de danos causados pela doença. Resultado esse, que pôde ser constatado na expressão da nota 4. Considerando os períodos de inoculação, *B+T* mostrou significância para essa variável, obtendo-se, assim, 6,58% de grau de dano nas brancas e 3,91% nas tintas (Tabela 12).

Para a nota 4, houve significância dos tratamentos para SG 01 (*B+24hT*, *T+24hB*), SG 02 e CM 02 (*T+24hB*), nas bagas brancas, SG 03 (*B+T*, *B+24hT*, *T+24hB*) e CM 01 (*T+24hB*), nas bagas tintas. Os sintomas incidiram em ambas as cultivares, não existindo, para essa variável, relação com ferimentos na superfície das bagas. Muitas vezes, mais de uma forma de penetração pode ocorrer a partir de um mesmo ou de diferentes conídios (ELAD et al., 2007). Nelson (1951) observou que *B. cinerea* pode penetrar diretamente através da cutícula da baga de uva. Outros pesquisadores relataram que aberturas naturais, como estômatos, e micro-

fissuras nas bagas também podem ser responsáveis pela penetração do patógeno (PUCHEU-PLANTÉ; MERCIER, 1983).

Tabela 12 –Grau de dano (G.D.) (%), causado por isolados de *Botrytis cinerea* em antagonismo com isolados de *Trichoderma* sp., classificados como nota 5 (bagas com sintomas e rachaduras) e nota 4 (bagas com sintomas) em três períodos de inoculação (P.I.) sobre bagas de uva de mesa brancas e tintas, cultivares ‘Niágara Branca’ e ‘Niágara Rosada’, respectivamente. Santa Maria, RS, 2011.

| Nota 5 | | | Nota 5 | | | Nota 4 | | |
|--------|---------------|----------|--------|---------------|----------|------------|--------|----------|
| Uva | P.I. | G.D. (%) | Uva | P.I. | G.D. (%) | P.I. | Uva | G.D. (%) |
| | <i>B+24hT</i> | 5,78 a | | <i>B+T</i> | 9,33 a | | Branca | 6,58 a |
| Branca | <i>B+T</i> | 2,44 b | Tinta | <i>B+24hT</i> | 4,44 b | <i>B+T</i> | | |
| | <i>T+24hB</i> | 0,66 b | | <i>T+24hB</i> | 3,33 b | | Tinta | 4,09 b |

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si (Scott-Knott $P \leq 0,05$). Dados originais foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$, para análise estatística.

Os tempos de inoculação demonstraram algumas diferenças com relação à incidência das notas 4 e 5. Em ambas as cultivares, houve uma tendência de diminuição dos danos por *B. cinerea*, quando os isolados antagonistas eram inoculados 24 horas anteriores aos isolados do patógeno (*T+24hB*). Essa forma de inoculação expressou uma tendência de controle mais efetivo. Como pôde ser observado para alguns isolados do patógeno, o grau de dano foi 0% em comparação com as testemunhas para todos os tratamentos aplicados.

A aplicação das suspensões de *Trichoderma* antes da aplicação das suspensões de *B. cinerea* garantiu aos antagonistas uma vantagem adaptativa de colonização sobre as bagas, aumentando a possibilidade de competição por espaço e nutrientes, ou, até mesmo, a indução de mecanismos de defesa no hospedeiro. Acredita-se que órgãos destacados, como bagas e cachos, também podem ativar

alguns processos metabólicos importantes, responsáveis pela defesa do órgão vegetal, induzidos pelo *Trichoderma* (BARANSKI et al., 2008).

De forma geral, o controle preventivo ($T+24hB$) sobressaiu-se de modo mais eficiente do que o controle curativo ($B+24hT$) e o controle sem intervalo de aplicação entre patógeno e antagonista ($B+T$), demonstrando a maior quantidade de unidades experimentais em que os tratamentos tiveram algum grau de significância no controle da podridão-cinzenta.



Figura 16 – Relação entre rachaduras e sintomas em bagas. a) Uvas tintas com rachaduras em maior quantidade, com expressão das notas 2 (rachaduras) e 5 (rachaduras e sintomas). b) Uvas brancas com rachaduras em menor quantidade e c) expressão da nota 4 nas mesmas. Santa Maria, RS, 2011.
Foto: Hamann, 2011.

2.4 Comentários finais

Em geral, o controle biológico da podridão-cinzenta (*B. cinerea*) na pós-colheita de uvas de mesa com o emprego de *Trichoderma* demonstrou que variedades comuns (cv. 'Niágara Branca' e cv. 'Niágara Rosada') apresentam suscetibilidade ao ataque de *B. cinerea*, apesar de serem consideradas mais rústicas e mais resistentes a doença.

Os menores valores de grau de dano em bagas inoculadas com agentes antagonistas podem fornecer uma estimativa da ação de *Trichoderma* sobre *B. cinerea* em uvas, assumindo-os como parte da avaliação da eficiência do controle desses agentes sobre agentes fitopatogênicos, porém, novos métodos precisam ser testados de modo a garantir uma avaliação mais precisa e segura da ação de

antagonistas sobre patógenos na pós-colheita de frutas, como uvas, em que a medição da área superficial danificada pelo patógeno ou controlada pelo antagonista torna-se muitas vezes inviável, evitando-se ou, pelo menos, diminuindo-se as estimativas de erros.

Ferimentos em bagas, como rachaduras, podem ser a principal via de infecção por *B. cinerea*, muitas vezes prioritária à coloração da epiderme como fator de suscetibilidade. As variações meteorológicas no vinhedo, como excesso de chuvas, também podem contribuir para o posterior rompimento da epiderme na pós-colheita.

A inoculação das suspensões do patógeno posteriores à inoculação das suspensões do antagonista demonstra maior eficiência de controle, sugerindo que o controle preventivo é a medida de controle mais eficiente na supressão de *B. cinerea* em uvas, podendo contribuir, dessa maneira, associado ao correto manuseio e armazenamento, ao aumento da vida útil de prateleira do produto.

2.5 Referências

BAKER, C. J.; STAVELY, J. R.; MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. **Plant Disease**, v. 69, p. 770-772, 1985.

BAR-SHIMON, M. et al. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Current Genetics**, v. 45, p. 140–148, 2004.

BARANSKI, R.; KLOCKE, E.; NOTHNAGEL, T. Chitinase CHIT36 from *Trichoderma harzianum* Enhances Resistance of Transgenic Carrot to Fungal Pathogens. **Journal of Phytopathology**, v. 156, n. 9, p. 513-521, 2008.

BENATO, E. A. et al. Controle de doenças pós-colheita de uva 'itália' e avaliação dos níveis residuais de SO₂ e thiabendazol. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 1, n. 2, p. 107-112, 1998.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 717-727.

BROOME, J. C. et al. Development of an infection model for *Botrytis* bunch rot of grapes based on wetness duration and temperature. **Phytopathology**, v. 85, p. 97–102, 1995.

CAPPELLINI, R. A.; CEPONIS, M. J.; LIGHTNER, G. W. Disorders in table grape shipments to the New York market, 1972-1984. **Plant Disease**., v. 70, p. 1075-1079, 1986.

COERTZE, S.; HOLZ, G. Epidemiology of *Botrytis cinerea* on grape: wound infection by dry, airborne conidia. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 23, p. 72-77, 2002.

COERTZE, S.; HOLZ, G.; SADIE, A. Germination and establishment of infection on grape berries by single airborne conidia of *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v. 85, p. 668-677, 2001.

COERTZE, S.; HOLZ, G. Surface colonization, penetration, and lesion formation on grapes inoculated fresh or after cold storage with single airborne conidia of *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v. 83, p. 917-924, 1999.

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

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens**, St. Paul: APS, 1983. 539p.

DE KOCK P. J.; HOLZ, G. Application of fungicides against postharvest *Botrytis cinerea* bunch rot of table grapes in the Western Cape. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 15, p. 33-40, 1994.

DEMISORY, L.; DEMISORY, H. The epidermal characteristics of fruit skin of some sweet cherry cultivars in relation to fruit cracking. **Pakistan Journal of Botany**, v. 36, n. 4, p. 725-731, 2004.

DROBY, S. et al. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and Technology**, v. 52, p. 137-145, 2009.

DROBY, S.; LICHTER, A. Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. In: ELAD, Y et al. (Eds.). **Botrytis – Biology, Pathology, and Control**, 1.ed, Amsterdã: Springer, 2007. cap. 19, p. 349-362.

DROBY, S. et al. Biologically based technology for the control of postharvest diseases of fruits and vegetables. In: WILSON, C., DROBY, S. (Eds.), **Microbial Food Contamination**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 187–206.

ECKERT, J.; SOMMER, N. Control of postharvest diseases of fruits and vegetables by postharvest treatment. **Annual Review of Plant Pathology**, v. 5, 391-432, 1967.

ELAD, Y. et al. **Botrytis**: biology, pathology and control. Dordrecht: Springer, 2007. 403 p.

ELAD, Y.; SHTIENBERG, D.; NIV, A. *Trichoderma harzianum* T39 integrated with fungicides; Improved biocontrol of grey mould. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE - PESTS AND DISEASES, 1994, Farnham. **Anais...** Farnham: British Crop Protection Council, 1994. p. 1109-1113.

ELAD Y. et al. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial green house conditions. **Plant Pathology**, v. 42, p. 324-332, 1993.

ELMER, P. A. G.; REGLINSKI, T. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. **Plant Pathology**, v. 55, p. 155–177, 2006.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258

FRIEL, D. et al. Separate and combined disruptions of two exo_-1,3-glucanase genes decrease the efficiency of *Pichia anomala* (Strain K) biocontrol against *Botrytis cinerea* on apple. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, p. 371–379, 2007.

HE, J. A. et al. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, 163-186, 2010.

JANISIEWICZ, W. J., TWORKOSKI, T. J., SHARER, C. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruit with a simple method to study competition for nutrients. **Phytopathology**, v. 90, n. 11, p. 1196–1200, 2000.

JEANDER, P.; BESSIS, R.; GAUTHERON, B. The production of resveratrol by grape berries in different developmental stages. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 42, p. 41-45, 1991.

LEV-YADUN; S.; GOULD, K. S. Role of anthocyanins in plant defence. In: GOULD, K. S. et al. (eds). **Anthocyanins**, Amsterdam: Springer, 2009,

LICHTER A, et al. Ethanol controls postharvest decay of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, p. 301–308, 2002. cap.2, p. 21-48.

NELSON, K. E. Harvesting and handling California table grapes for market. **Davis**: Division of Agricultural Sciences, University of California, 1979. 67p.

NELSON, K. E. Effect of humidity on infection of table grapes by *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, v. 41, p. 859-864, 1951.

O'NEIL, T. M. et al. Control of grapevine grey mould with *Trichoderma harzianum* T39. **Biocontrol Science and Technology** v. 6, p. 139-146, 1996.

PUCHEU-PLANTÉ B; MERCIER, M Étude ultrastructurale de l'interrelation hôte-parasite entre Le raisin et le champignon *Botrytis cinerea*: exemple de la pourriture noble en Sauternais. **Canadian Journal of Botany**, v. 61, p. 1785-1797, 1983.

RASPOR, P. et al. Biocontrol of *B. cinerea* with wine yeasts. **Food Technology Biotechnology**, v. 48, n. 3, p. 336–343, 2010.

SOMMER, N. Role of controlled environments in suppression of postharvest diseases. Canadian **Journal of Plant Pathology**, v. 7, p. 331, 1985.

SÔNEGO, O.; GARRIDO, L. R.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Doenças fúngicas. In: FAJARDO, T. V. M. (Ed). **Uva Para Processamento**: Fitossanidade. Brasília: EMBRAPA, 2003. cap. 2, p. 11-44.

SÖYLEMEZOGLU, G.; AGAOGLU, Y. S. Research on the effect of grape guard during the cold storage of Thompson Seedless cv. **Acta Horticulturae**, v. 368, p. 817-825, 1994.

SHTIENBERG, D.; ELAD Y. Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, v. 87, p. 332-339, 1997.

TRONSMO, A.; DENNIS, C. The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 83, p. 449-455, 1974.

WILSON, C. L.; Pusey, P. L. Potential for biological control of postharvest plant diseases. **Plant Disease**, v. 69, p. 375–378, 1985.

WILSON, C. L.; PUSEY, P. L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, v. 68, p. 753-756, 1984.

WISNIEWSKI, M. et al. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondi* L. Characterization of the attachment to *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 39, p. 245–258, 1991.