



Seleção de antagonistas para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em tomateiro sob cultivo protegido¹

Carla Azambuja Centeno Bocchese², Bruno Brito Lisboa³, José Ricardo Pfeifer Silveira⁴, Luciano Kayser Vargas⁵, Bernadete Radin⁶, Andréia Mara Rotta de Oliveira⁷

Resumo - Os isolados foram obtidos de amostras de tecido vegetal do filoplano e rizoplano de tomateiro e solo da região produtora do Rio Grande do Sul. Os testes *in vitro* foram baseados no método de culturas pareadas, na produção de compostos voláteis e no crescimento em meio de cultura contendo fungicida. Os testes *in vivo* avaliaram a eficiência dos dois melhores antagonistas selecionados *in vitro* por meio da incidência de *Botrytis cinerea* em flores de tomateiro, sob diferentes formas de aplicação. Os resultados obtidos evidenciaram que o isolado de *Gliocladium viride* apresenta potencial para o controle de *B. cinerea*, pois ocasionou uma redução de 62%, em relação ao tratamento de controle. Esse resultado foi similar ao encontrado pelo método de culturas pareadas, efetuado em laboratório, cujo percentual inibitório à *B. cinerea* foi de 58,14%. Já o isolado de *Trichoderma harzianum* não diferenciou-se significativamente do tratamento de controle.

Palavras-chave: controle biológico, mofo cinza, ambiente protegido.

Selection of antagonists for the biological control of *Botrytis cinerea* in tomato grown under protected cultivation

Abstract - The isolates were obtained from vegetal tissue, phylloplane-rhyzoplane of tomato and soil in the growing region of Rio Grande do Sul. "In vitro" tests were based in the method of paired crops culture, in the production of volatile compounds and growth in culture media containing fungicide. "In vivo" tests measured the efficiency of the two most efficient isolates selected by "in vitro" experiments through the evaluation of the incidence of *Botrytis cinerea* in tomato flowers under different forms of application. *Gliocladium viride* led to a 62% reduction and was considered a promising alternative for the biological control of *B. cinerea*. This result was similar to that obtained through the test of paired crops ran under laboratory conditions. In this test, the efficiency of *G. viride* was 58.14%. *Trichoderma harzianum* did not differ significantly from the control treatment.

Key words: Biological control, gray mold, environmental protection.

¹ Trabalho realizado com recursos do CNPq e FAPERGS.

² Eng. Agr. Dra., Bolsista do CNPq, UERGS/Prof., carla-bocchese@uergs.edu.br - Autor para correspondência.

³ Eng. Agr.B. Sc., FEPAGRO/Fitopatologia.

⁴ Eng. Agr. Dr., FEPAGRO/Fitopatologia.

⁵ Eng. Agr. Dr., FEPAGRO/Fitopatologia.

⁶ Eng. Agr. Dra., FEPAGRO/Centro de Meteorologia Aplicada.

⁷ Biol. Dra., UERGS/Prof.

Recebido para publicação em 13/03/2006



Introdução

A produção de tomates na safra e entressafra sob cultivo protegido oferece maior versatilidade e rendimento para os produtores, mas predispõe esta cultura a condições ideais para o desenvolvimento do mofo cinza, cujo agente *Botrytis cinerea* causa severas perdas de rendimento neste sistema de produção. A principal forma de controle ainda é a química, onde a grande variabilidade genética e esporulação deste patógeno representa alto risco para obtenção de resistência aos principais fungicidas (GHINI, 1996).

A incidência de *B. cinerea* é favorecida por temperaturas em torno de 20°C e alta umidade, coincidentes com o inverno e início da primavera no Rio Grande do Sul. As flores e folhas do tomateiro são altamente suscetíveis a *B. cinerea* e são os primeiros tecidos a exibirem as lesões. O dano econômico ocasionado por esse patógeno é oriundo das manchas necróticas nos frutos maduros, que os desqualificam para a comercialização, das infecções que circundam o caule e matam a planta antes da colheita (KIMATI et al., 1997).

Trichoderma sp., antagonista típico de solo, vem sendo testado para o controle de *Botrytis cinerea* em diferentes culturas. Zimand et al., (1996) verificaram que *T. harzianum* T39 reduziu a germinação e a alongação do tubo germinativo de *B. cinerea* em folhas de feijoeiro. Elad e Shitienberg (1996) demonstraram a efetividade de *T. harzianum* (T39) em adição a fungicidas no controle de *B. cinerea* em pepino. *Gliocladium roseum* vem sendo comercializado para controle de *B. cinerea* do morangueiro cultivado em casa de vegetação. Este antagonista tem se mostrado tão efetivo quanto os fungicidas quando aplicado no período do florescimento da cultura (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 1995). Utkhede et al., (2001) compararam a eficiência de tratamentos químicos e biológicos, em casa de vegetação, para o controle de *B. cinerea* em tomateiro. Os resultados obtidos por este pesquisador evidenciaram o potencial de *T. harzianum* para o controle de *B. cinerea* em cultivos protegidos.

A utilização de *Trichoderma* sp. e *Gliocladium* sp. como biocontroladores apresenta inúmeras vantagens: apresentam bom desempenho no controle de fungos fitopatogênicos, são inócuos ao ser humano, não apresentam impacto negativo ao meio ambiente, apresentam estruturas de reprodução de fácil propagação, principalmente em substratos naturais, apresentam uma meia-vida de prateleira formulada, razoavelmente longa e com boa viabilidade (MARIANO, 1993).

A grande maioria dos trabalhos publicados em controle biológico de doenças de plantas abrange uma seleção realizada em laboratório. A grande ênfase na rejeição dos testes de seleção “*in vitro*” é baseada em que, na maioria das vezes, os resultados não coincidem ou são totalmente discrepantes daqueles realizados “*in vivo*”, seja

em casa-de-vegetação, sob condições controladas, seja a campo (ANDREWS, 1992). Apesar das restrições quanto à eficácia da seleção de antagonistas “*in vitro*”, essa técnica ainda é bastante utilizada na detecção de potenciais biocontroladores em grandes populações (MARIANO, 1993). Ethur et al. (2005), utilizaram várias das metodologias preconizadas por Mariano (1993) para a seleção de fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa.

O objetivo deste trabalho foi selecionar isolados de *Trichoderma* sp. e *Gliocladium* sp. de culturas de tomateiro de diferentes localidades do Rio Grande do Sul, que possam reduzir a ação de *B. cinerea* e outros fungos fitopatogênicos na cultura do tomateiro em ambiente protegido, a fim de diminuir a utilização de fungicidas químicos e gerar um sistema alternativo de controle que apresente menor impacto ambiental.

Material e métodos

1 Obtenção de isolados de *Trichoderma* sp. e *Gliocladium* sp com potencial antagonístico a *Botrytis cinerea*

Os isolados *Trichoderma* sp. e *Gliocladium* sp. foram obtidos a partir de amostras de tecido vegetal do filoplano e rizoplano de plantas adultas de tomateiro e solo da região produtora do Rio Grande do Sul. O isolado de *B. cinerea* foi obtido de flores de tomateiro da localidade de Eldorado do Sul (RS). Os isolados de *Fusarium oxysporum* e *Septoria lycopersici* foram obtidos de amostras do rizoplano e filoplano, respectivamente, de plantas de tomateiro.

As flores, folhas e raízes de tomateiro foram inicialmente desinfestadas em solução de hipoclorito a 1%, por 1 minuto, seguido por imersão em água destilada autoclavada. Após, partes de folhas, raízes, e flores foram plaqueadas separadamente em BDA (meio Agar batata dextrose). Porções de 10 g de solo e substrato, separadamente, foram imersas em 50 mL de água destilada autoclavada e mantidas sob agitação por 10 minutos. Alíquotas de 100 mL desta solução foram espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski em placas contendo meio de cultura BDA. As colônias com as características morfológicas de *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp., *B. cinerea*, *F. oxysporum* e *S. lycopersici* foram repicadas isoladamente em placas de Petri contendo meio de cultura BDA para identificação segundo Domsch et al. (1980). Foram obtidos, inicialmente, 300 isolados, dentre os quais apenas 36 foram identificados como *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride*.

A coleção de antagonistas e patógenos utilizada neste trabalho consta de 39 isolados (Tabela 1): *Trichoderma* sp. (23), *Gliocladium* sp. (13) oriundos, principalmente, da rizosfera, do solo e do substrato de culturas de tomateiro; Os isolados de *B. cinerea* (1), *F. oxysporum* (1) e *S. lycopersici* (1) foram obtidos, respectivamente, de flores com sintomas característicos do mofo cinzento, de amos-

tras de rizoplano e filoplano, com manchas necróticas, de plantas de tomateiro.

Tabela 1 - Coleção de isolados. Laboratório de Fitopatologia da FEPA-GRO. Porto Alegre, RS, 2003-2004.

Isolados	Número	Origem
<i>Gliocladium viride</i>	13	Porto Alegre
<i>Trichoderma harzianum</i>	8	Porto Alegre
<i>Trichoderma harzianum</i>	5	Viamão
<i>Trichoderma harzianum</i>	9	Eldorado do Sul
<i>Trichoderma harzianum</i>	1	Vacaria
<i>Botrytis cinerea</i>	1	Eldorado do Sul
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	Eldorado do Sul
<i>Septoria lycopersici</i>	1	Eldorado do Sul

2 Identificação e preservação dos antagonistas aos fitopatógenos

Os isolados de *Trichoderma* sp. e de *Gliocladium* sp., selecionados em testes “*in vitro*”, foram identificados em nível de espécie, com o auxílio de microscópio estereoscópico e ótico, considerando-se a coloração da colônia, em meio BDA, e a morfologia dos conidióforos, fiáldes e conídios, de acordo com a chave de Domsch et al. (1980), como *T. harzianum* e *G. viride*. Os isolados foram preservados em papel e em tubos com meio de cultura BDA para as repicagens durante o trabalho. A coleção foi mantida à temperatura de 4°C no Laboratório de Fitopatologia da FEPAGRO.

3 Seleção *in vitro* dos antagonistas (segundo metodologia de Mariano, 1993)

3.1 Avaliação do potencial antagonístico a *Botrytis cinerea*.

Esta avaliação foi precedida pela elaboração de uma curva de crescimento e plaqueamento diferencial, onde foram avaliadas as condições competitivas de ambos os fungos, a fim de que obtivessem no teste a igualdade de condições de crescimento. *B. cinerea* apresentou crescimento micelial mais lento em meio de cultura BDA que os antagonistas, necessitando de 216 horas de incubação à 23°C para obter 9 cm de diâmetro nas colônias. Os isolados de *T. harzianum* e *G. viride* obtiveram o mesmo crescimento em apenas 168 horas.

A avaliação do potencial de controle dos antagonistas *in vitro* foi realizada por meio do método de culturas pareadas. A aplicação deste método consistiu na deposição de dois discos de 5 mm de diâmetro, em placas com meio BDA, dispostos em dois pontos opostos e equidistantes das bordas das placas, contendo estruturas do provável antagonista e do fitopatógeno. Na montagem do pareamento houve antecipação de dois dias na deposição dos discos de *B. cinerea* nas placas com meio de cultura BDA, em vista de seu crescimento micelial em relação aos antagonistas. Após a colocação dos antagonistas nas placas estas foram incubadas

por 7 dias na temperatura de 23°C e fotoperíodo de 12 horas.

O tratamento de controle consistiu da deposição centralizada de um disco de 5 mm de diâmetro de meio contendo *B. cinerea* em placas com meio BDA. Os diâmetros das colônias do fitopatógeno foram medidos e comparados com o crescimento do tratamento de controle. O percentual de inibição de *B. cinerea* foi calculado do seguinte modo:

$$I (\%) = (1 - [\text{crescimento de } B. \text{cinerea} - \text{crescimento do controle}] \times 100)$$

O ensaio foi realizado com 36 isolados de antagonistas, 1 isolado de *B. cinerea* (controle), com 4 repetições (cada placa = 1 repetição), totalizando a avaliação de 148 placas.

A avaliação visual também foi realizada, após 10 dias de incubação, com base em escala, proposta por Bell et al. (1982), mostrada a seguir.

Escala:

Nota 1: Antagonista crescendo sobre toda a placa de Petri.

Nota 2: Antagonista crescendo sobre, aproximadamente, 75% da placa de Petri.

Nota 3: Antagonista crescendo sobre aproximadamente, 50% da placa de Petri.

Nota 4: Patógeno crescendo sobre, aproximadamente, 75% da placa de Petri.

Nota 5: Patógeno crescendo sobre toda a placa de Petri.

3.2 Avaliação do crescimento micelial e produção de conídios dos isolados de *T. harzianum* e *G. viride* em meio de cultura BDA

O crescimento micelial dos isolados de *T. harzianum* e *G. viride* foi avaliado por meio da medição do diâmetro das colônias crescidas em meio de cultura BDA, a 23°C e fotoperíodo de 12 horas, por 48 horas.

A produção de conídios dos isolados potencialmente antagonistas à *B. cinerea* foi avaliada, em condições semelhantes às anteriores, porém após 7 dias de incubação. O preparo da suspensão de conídios para a contagem foi realizado do seguinte modo: acrescentou-se um volume de 10 mL de água destilada esterilizada às placas de Petri e, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, realizou-se uma remoção da massa micelial, com o objetivo de suspender os conídios na água. Após, 100 µL da suspensão homogeneizada foram utilizados para a contagem em Câmara de Neubauer.

Para este ensaio foram utilizados 36 isolados (1 isolado = 1 tratamento) com 4 repetições (1 placa = 1 repetição), totalizando a avaliação de 144 placas.

3.3 Avaliação do potencial antagonístico a outros fungos fitopatogênicos para cultura do tomateiro

A metodologia aplicada foi semelhante à descrita no item 3.1. A avaliação competitiva de *F. oxysporum* e *S. lycopersici* determinou que houvesse uma

antecipação de 48 horas no plaqueamento de *Septoria lycopersici* para a montagem do pareamento nas placas de Petri.

Neste ensaio foram utilizados apenas 9 isolados (isolado = 1 tratamento) representativos da coleção de antagonistas, 1 isolado de *F. oxysporum* e 1 de *S. lycopersic*. Foi elaborado com 20 tratamentos (1 tratamento = 1 isolado) com 4 repetições (1 repetição = 1 placa), totalizando a avaliação de 80 placas.

Os tratamentos de controle consistiram apenas na deposição centralizada de 1 disco de 5 mm de diâmetro de meio contendo *F. oxysporum* e *S. lycopersici*, separadamente, em placas com meio BDA.

3.4 Avaliação da compatibilidade entre os agentes de biocontrole selecionados

Em trabalhos recentes, Guetsky et al. (2001) preconizaram que a aplicação de mais de um antagonista, com diferentes requerimentos ecológicos, pode aumentar a eficiência e diminuir a variabilidade do controle biológico. Logo, aplicações simultâneas de *T. harzianum* e *G. virens* podem melhorar a eficiência do controle biológico para *B. cinerea* e de outros fungos patogênicos à cultura do tomate em ambiente protegido. Em vista da possibilidade da utilização de tratamentos com aplicação simultânea de dois antagonistas (no solo, sementes e foliar), fez-se necessária a avaliação do antagonismo entre os agentes de biocontrole selecionados. A metodologia foi similar à descrita no item 3.1, sendo que neste ensaio foram utilizados 5 isolados de *T. harzianum* e 3 isolados de *G. viride*.

Os tratamentos de controle consistiram apenas na deposição centralizada de 1 disco de 5 mm de diâmetro de meio contendo 1 isolado (*T. harzianum* ou *G. viride*) em placas com meio BDA. Todas as placas foram incubadas por 7 dias em temperatura de 23°C e fotoperíodo de 12 horas. Foi realizada a avaliação visual, após 10 dias de incubação, baseada na escala, proposta por Bell et al. (1982) (modificada pelos autores), mostrada a seguir.

Escala:

Nota 1: O isolado de *T. harzianum* cresce sobre, aproximadamente, 75% da placa de Petri; inibe 25% o crescimento de *G. viride*.

Nota 2: O isolado de *G. viride* cresce sobre, aproximadamente, 75% da placa de Petri; inibe 25% o crescimento de *T. harzianum*.

Nota 3: *T. harzianum* cresce 50% e *G. viride*, 50% da placa.

Nota 4: Formação de halo entre as duas colônias pareadas, sem a presença de conídios.

Este ensaio constou de 18 tratamentos (1 tratamento = 1 isolado de *T. harzianum* x 1 isolado de *G. viride*) e 8 tratamentos de controle, com 4 repetições (1 repetição = 1 placa), totalizando a avaliação de 104 placas.

3.5 Avaliação da capacidade dos antagonistas para produção de compostos voláteis

Os isolados representativos de antagonistas da coleção também foram testados para a avaliação da produção de metabólitos voláteis, com atuação sobre o desenvolvimento de *B. cinerea*. Neste ensaio foi utilizado o cultivo em placas de Petri sobrepostas contendo meio de cultura BDA, uma delas inoculada com o patógeno e outra com antagonista. As placas foram incubadas a 23°C com fotoperíodo de 12 horas, por 7 dias. A avaliação da capacidade dos antagonistas para produção de compostos voláteis foi realizada pela medição do diâmetro das colônias de *B. cinerea* crescidas no meio após o período de incubação e em contato com gases produzidos pelos possíveis antagonistas. Essa medição foi comparada com o controle, onde *B. cinerea* cresceu sem a presença de antagonistas.

Este ensaio constou de 10 tratamentos e 4 repetições, totalizando a avaliação de 40 placas.

4 Efeito de Benomil sobre o crescimento dos antagonistas testados (segundo metodologia de Ghini e Vitti, 1996)

Avaliou-se “*in vitro*” o efeito de Benomil (ingrediente ativo: 500 g/kg), fungicida comumente utilizado no controle de doenças do tomateiro em estufa, sobre o crescimento de *T. harzianum* e *G. viride*.

O fungicida foi testado a 0, 1, 2, 5 e 10 ppm do ingrediente ativo de Benomil, adicionado ao meio de BDA fundido ($\pm 45^\circ\text{C}$) e em seguida vertido em placas. Após a solidificação do meio, no centro de cada placa, foi colocado um disco de micélio de 5 mm de diâmetro, retirado das margens de colônias de *T. harzianum* e *G. viride* cultivados em BDA, com 10 dias de cultivo. As placas foram mantidas em temperaturas de laboratório ($\pm 25^\circ\text{C}$) sob fotoperíodo de 12 horas, por 48 horas, determinado-se os diâmetros médios das colônias. O ensaio constou de 40 tratamentos com 4 repetições, totalizando 196 placas.

5 Testes *in vivo*

5.1 Efeito de *T. harzianum* e *G. viride* na emergência e no desenvolvimento de plântulas de tomateiro

O experimento foi conduzido na Estação Experimental da FEPAGRO localizada em Eldorado do Sul (RS), em casa de vegetação. O experimento constou dos seguintes tratamentos: T0: Controle (sem aplicação de antagonistas na semente e substrato comercial Plantmax, sem esterilização); T1: TRIC -30 no substrato e sementes de tomateiro; T2: aplicação de GLIO -10 no substrato e sementes de tomateiro; T3: aplicação simultânea de TRIC -30 e GLIO -10 no substrato e sementes de tomateiro. Os tratamentos foram feitos com 4 repetições, sendo que cada um deles constou do plantio de 26 sementes de tomateiro. As sementes foram revestidas com uma

suspensão de 4×10^8 conídios mL^{-1} do(s) antagonista(s) acrescida de um agente adesivo (KLEIFELD e CHET, 1992). Ao substrato, foram adicionados 5 g de antagonista (cultivado em arroz), na concentração de 10^8 conídios g^{-1} , para cada 1 kg de substrato.

A avaliação foi feita pelo número de plantas emergidas após sete e dez dias de cultivo onde foram determinados altura da parte aérea (cm), comprimento da raiz (cm) e peso da matéria seca (g) de 10 plantas coletadas por repetição. A avaliação da altura de planta e comprimento de raiz foi realizada com o auxílio de régua milimetrada, medindo do colo da planta até a axila da última folha e do colo até o final da última radícula inserida na raiz principal, respectivamente. Já para a avaliação da matéria seca (raiz desidratada), as raízes das plantas foram lavadas em água corrente e acondicionadas, separadamente, em sacos de papel, e em seguida secas em estufa com temperatura regulada a 60°C , até o material atingir peso constante.

5.2 Persistência de *T. harzianum* e *G. viride* nas raízes de plântulas de tomateiro

O ensaio na casa de vegetação consistiu dos seguintes tratamentos:

(t0): Nenhum tratamento com os biocontroladores.

(t1): Inoculação de GLIO – 10 nas sementes de tomateiro.

(t2): Inoculação de TRIC – 30 nas sementes de tomateiro.

(t3): Inoculação simultânea de GLIO – 10 e TRIC – 30 nas sementes de tomateiro.

As sementes foram revestidas com uma suspensão de 4×10^8 conídios mL^{-1} do(s) antagonista(s) acrescida de um agente adesivo (KLEIFELD e CHET, 1992).

Os 4 tratamentos foram realizados, com 4 repetições, sendo que cada um deles constou da avaliação de 40 radículas oriundas de 20 plântulas de tomateiro, após 15 dias da emergência. Duas radículas de cada plântula foram removidas e desinfestadas, com hipoclorito a 1%, durante 2 minutos. Após foram transferidas para placa de Petri contendo BDA mais tetraciclina (250mq/L), sendo dispostas 5 radículas por placa. As avaliações foram efetuadas aos 4 dias de incubação a 23°C , fotoperíodo de 12 horas, pela contagem do número de radículas com crescimento dos antagonistas, sendo posteriormente determinada a média de incidência. Os antagonistas foram repicados para placas contendo BDA para o procedimento de identificação segundo Domsch et al. (1980).

5.3 Efeito dos tratamentos com *T. harzianum* e *G. viride* na incidência de *B. cinerea* em flores planta¹

O ensaio em estufa consistiu dos seguintes tratamentos:

Testemunha: Nenhum tratamento com os biocontroladores.

G. viride (T1): Biocontrolador no substrato, semente e cova (plantio).

G. viride (T2): Biocontrolador apenas em pulverizações foliares semanais 7 dias após o plantio.

G. viride (T3): Biocontrolador no substrato, semente, cova (plantio) e nas pulverizações semanais foliares.

T. harzianum (t1): Biocontrolador no substrato, semente e cova (plantio).

T. harzianum (t2): Biocontrolador apenas em pulverizações foliares semanais 7 dias após o plantio.

T. harzianum (t3): Biocontrolador no substrato, semente, cova (plantio) e nas pulverizações foliares semanais.

Os tratamentos foram repetidos 4 vezes, sendo que cada um deles constou de 12 plantas de tomateiro. As sementes foram revestidas com uma suspensão de 4×10^8 conídios/ mL do(s) antagonista(s) acrescida de um agente adesivo (KLEIFELD e CHET, 1992). No substrato, foram adicionados 5 g de antagonista (cultivado em arroz), na concentração de 10^8 conídios/ g , para cada 1 kg de substrato. As aplicações dos antagonistas (3×10^8 conídios mL^{-1}) foram feitas com pulverizador costal, a partir da emergência, em intervalos de sete dias.

A avaliação foi realizada por meio de 2 coletas aleatórias, a primeira após 15 dias e a segunda 30 dias do início do florescimento, de 10 flores parcela⁻¹. As flores coletadas foram removidas, assepticamente, e transferidas para placa contendo BDA mais tetraciclina (250mg/L), sendo dispostas 5 flores por placa. As avaliações foram efetuadas aos 4 dias de incubação a 23°C , fotoperíodo de 12 horas, pela contagem do número de flores com crescimento do patógeno, sendo posteriormente determinada a média de incidência.

6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e para comparação de médias empregou-se o Teste Tukey, utilizando o programa computacional SAS.

Resultados e discussão

A inibição de *B. cinerea* por *T. harzianum* em relação ao tratamento de controle variou de 42,31 a 74,41% (Tabela 2). Os isolados de *T. harzianum* que apresentaram maior efeito inibitório foram: TRIC – 30 (74,41%), TRIC – 36 (72,49%), TRIC – 35 (70,42%), TRIC – 17 (70,42%) e TRIC – 33 (70,42%). Já os isolados de *G. viride* apresentaram uma menor variação, de 50,74 a 60,06%. Os melhores isolados de *G. viride* para o controle de *B. cinerea* foram: GLIO – 12 (60,06%), GLIO – 7 (60,06%), GLIO – 10 (58,14%) e GLIO – 6 (57,70%).

As notas da avaliação visual foram feitas após um período de 10 dias, quando foi possível observar o crescimento dos melhores isolados de *T. harzianum* e *G. viride* sobre a colônia de *B. cinerea*, o que pode justificar a ausência de correlação entre o percentual de inibição contra *B. cinerea* e as notas da avaliação visual do antago-

Testes *in vitro*

Tabela 2 - Ação inibitória contra *Botrytis cinerea* (%) e notas da avaliação visual do antagonista em presença do patógeno; crescimento micelial (diâmetro da colônia) e produção de conídios em meio de cultura BDA.

Isolados	% Inibição <i>Botrytis cinerea</i>	5%	Avaliação visual (nota)	Crescimento micelial	Produção de conídios X 50.000 mL ⁻¹
TRIC – 30	74,41	a	1	6,96	bcd
TRIC – 36	72,49	ab	2	6,70	cde
TRIC – 35	70,42	abc	2	7,23	abcd
TRIC – 17	70,42	abc	2	4,13	hijkl
TRIC – 33	70,42	abc	2	7,5	abc
GLIO – 12	60,06	abc	2	3,66	klm
TRIC – 37	62,58	abcd	2	5,93	ef
GLIO – 7	60,06	abcde	2	4,43	hji
TRIC – 11	59,62	abcdef	2	4,83	gh
TRIC – 29	58,14	abcdef	2	7,23	abcd
GLIO – 10	58,14	abcdef	1	5,96	ef
TRIC – 15	58,14	abcdef	2	4,43	hji
GLIO – 6	57,70	abcdef	1	5,96	ef
TRIC – 31	57,59	abcdef	2	6,60	de
TRIC – 21	57,70	abcdef	1	4,86	gh
TRIC – 32	57,11	abcdef	1	7,46	abc
TRIC – 19	57,11	abcdef	1	4,6	ghi
TRIC – 3	57,11	abcdef	2	3,83	ijkl
GLIO – 13	56,66	bcdef	2	2,93	m
GLIO – 14	56,66	bcdef	2	4,16	hijkl
TRIC – 34	56,66	bcdef	2	7,63	ab
TRIC – 18	56,22	bcdef	2	4,90	gh
GLIO – 4	56,22	bcdef	2	5,33	fg
GLIO – 5	56,22	bcdef	2	4,13	hijkl
TRIC – 8	56,22	bcdef	1	7,83	a
GLIO – 1	55,14	bcdef	2	4,46	hij
TRIC – 14	54,64	cdef	2	3,76	jkl
TRIC – 24	53,70	cdef	2	4,86	gh
GLIO – 2	53,66	cdef	2	4,3	hijk
GLIO – 9	51,19	def	1	3,46	lm
TRIC – 16	51,19	def	2	5,33	fg
GLIO – 11	50,74	def	2	3,5	klm
TRIC – 23	50,30	def	1	4,76	gh
TRIC – 22	46,26	def	1	4,23	hijkl
TRIC – 26	43,35	ef	2	4,6	ghi
TRIC – 20	42,31	f	2	4,16	hijkl

*Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Escala:

Nota 1: Antagonista crescendo sobre toda a placa de Petri.

Nota 2: Antagonista crescendo sobre, aproximadamente, 75% da placa de Petri.

Nota 3: Antagonista crescendo sobre aproximadamente, 50% da placa de Petri.

Nota 4: Patógeno crescendo sobre, aproximadamente, 75% da placa de Petri.

Nota 5: Patógeno crescendo sobre toda a placa de Petri.

Codificação dos isolados:

As abreviações TRIC e GLIO correspondem a isolados de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride*, respectivamente. Os números são utilizados para diferenciá-los dentro da coleção, uma vez que cada isolado apresenta diferenças genéticas frente a outro isolado da mesma espécie.

nista em presença do patógeno. Os dados obtidos com a avaliação visual foram decisivos para a seleção de um grupo de isolados para os demais testes “*in vitro*”. Os isolados selecionados, que obtiveram a nota 1, foram: TRIC – 30, GLIO – 10, TRIC – 8, TRIC – 32, GLIO – 9, TRIC – 23, TRIC – 21, TRIC – 19 e GLIO – 6.

Os dados referentes ao crescimento micelial (diâmetro da colônia [cm]) e produção de conídios (Tabela 2) não apresentaram correlação significativa com a ação inibitória dos isolados de *T. harzianum* e *G. viride* à *B. cinerea*. Dentre os isolados de *G. viride*, GLIO – 10, destacou-se dos demais tanto no crescimento micelial (5,95

cm) como na produção de conídios (18,33 x 50.000 conídios/mL), obtendo os maiores valores dentro da sua espécie. O isolado de *T. harzianum*, TRIC – 30, apesar de apresentar o maior valor inibitório sobre *B. cinerea*, em relação ao crescimento micelial e produção de conídios obteve valores intermediários quando comparado com os demais isolados.

A inibição do crescimento de *S. lycopersici* e *F. oxysporum*, dois patógenos que ocasionam danos de relevância na cultura do tomateiro, pelos isolados de *T. harzianum* e *G. viride* (Tabela 3) variou de 22,29 a 49,32% e 13,63 a 44,15%, respectivamente. O isolado TRIC – 32

SELEÇÃO DE ANTAGONISTAS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE
Botrytis cinerea EM TOMATEIRO SOB CULTIVO PROTEGIDO

obteve o maior percentual de inibição tanto contra *S. lycopersici* (49,32%) como para *F. oxysporum* (44,15%). O isolado TRIC – 30 apresentou um nível médio de inibição contra *S. lycopersici* (33,77%) e um baixo nível de inibição contra *F. oxysporum* (13,63%). Entretanto, na avaliação visual obteve nota 2 nos percentuais de inibição ocasionados à *F. oxysporum* e *S. lycopersici*. O isolado GLIO – 10 também apresentou nível médio de inibi-

ção em relação a *S. lycopersici* (27,02%) e em relação a *F. oxysporum* (31,16%). As avaliações visuais do pareamento de GLIO – 10 com isolados dos patógenos, evidenciaram baixa eficiência no controle de *S. lycopersici* e alta para *F. oxysporum*. Segundo Fokkema (1996), o sucesso dos antagonistas é determinado não somente por sua ação antagonística direta, mas também pela possível duração da interação entre antagonista e patógeno.

Tabela 3 - Ação inibitória de isolados de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* contra *Septoria lycopersici* e *Fusarium oxysporum* (%) e notas da avaliação visual do antagonista em presença do patógeno.

Tratamentos	Inibição (%)		Avaliação Visual (Nota)	Inibição (%)		Avaliação Visual (Nota)
	<i>Septoria lycopersici</i>			<i>Fusarium oxysporum</i>		
TRIC – 30	33,77	ab	2	13,63	c	2
GLIO – 10	27,02	ab	3	31,16	abc	1
TRIC – 8	43,91	ab	1	31,81	abc	3
TRIC – 32	49,32	a	2	44,15	a	1
GLIO – 9	24,04	ab	3	27,91	abc	3
TRIC – 23	38,51	ab	1	28,56	abc	2
TRIC – 21	47,29	ab	1	21,42	bc	3
TRIC – 9	45,26	ab	2	31,81	abc	1
GLIO – 6	22,29	b	2	37,01	ab	2

*Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Escala:

Nota 1: Antagonista crescendo sobre toda a placa de Petri.

Nota 2: Antagonista crescendo sobre, aproximadamente, 75% da placa de Petri.

Nota 3: Antagonista crescendo sobre aproximadamente, 50% da placa de Petri.

Nota 4: Patógeno crescendo sobre, aproximadamente, 75% da placa de Petri.

Nota 5: Patógeno crescendo sobre toda a placa de Petri.

O crescimento micelial (diâmetro das colônias [cm]) de *B. cinerea* em presença de compostos voláteis oriundos de isolados de *T. harzianum* e *G. viride* (Tabela 4) apresentou redução de até 46,8%, obtido pelo isolado GLIO – 6, em relação ao tratamento controle. Os isolados que se destacaram na produção de compostos voláteis foram: GLIO – 6 (46,8%), TRIC – 19 (40,47%), TRIC – 21 (40,47%), TRIC – 23 (39,73%), GLIO – 9 (38,24%), TRIC – 32 (36%). Os isolados GLIO – 10 e TRIC – 30 demonstraram produzir baixa quantidade de compostos voláteis com efeito inibitório sob o crescimento micelial de *B. cinerea*.

A avaliação da compatibilidade entre os isolados de *T. harzianum* e *G. viride* (Tabela 5), pelo método de cul-

turas pareadas, demonstrou que podem existir relações antagonísticas mesmo dentre os agentes biocontroladores. O isolado de *T. harzianum*, TRIC – 19, apresentou redução de 25% em seu crescimento micelial quando pareado, com os três isolados de *G. viride*. Outra reação de incompatibilidade para crescimento micelial simultâneo foi observado com o isolado de *T. harzianum*, TRIC – 21, que apresentou formação de halo e inexistência de conídios quando pareado com os isolados de *G. viride*. Os demais isolados testados apresentaram compatibilidade, pois houve uniformidade no crescimento micelial entre os isolados, quando pareados em placas contendo meio de cultura BDA. Além disso, não foram observadas reações antagonísticas entre eles. Segundo Guetsky et al. (2002), a introdução de 2 ou mais agentes biocontroladores na fitosfera, com diferentes requerimentos ecológicos, poderá facilitar e aumentar a consistência do controle da doença sem afetar a eficácia dos biocontroladores. Entretanto, de acordo com os resultados obtidos, deve ser testada previamente a compatibilidade entre eles, uma vez que podem apresentar reações antagonísticas.

Como as doenças associadas à fitosfera não são de ocorrência isolada, o uso de bioagentes deve ser integrado com outras práticas agrícolas. Muitas dessas práticas interferem com o bioagente diretamente e/ou alteram o equilíbrio da comunidade microbiana do filoplano (MELO, 1996). Deste modo, tornou-se necessária a seleção de isolados com maior resistência aos produtos mais utilizados na cultura, como o Benomil, recomendado para

Tabela 4 - Crescimento micelial de *Botrytis cinerea* em culturas desenvolvidas em presença de metabólitos voláteis

Tratamentos	Diâmetro das colônias	
Controle	6,72	a'
TRIC – 30	6,30	ab
GLIO – 10	5,07	bc
TRIC – 8	4,32	cd
TRIC – 32	4,30	cd
GLIO – 9	4,15	cd
TRIC – 23	4,05	cd
TRIC – 21	4,00	cd
TRIC – 19	4,00	cd
GLIO – 6	3,57	d

de isolados de *Trichoderma harzianum* e de *Gliocladium viride*.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.

Tabela 5 - Compatibilidade entre os isolados de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* pelo método de culturas pareadas.

<i>Trichoderma harzianum</i> Isolado n°	<i>Gliocladium viride</i> Isolado n°	Nota
GLIO – 6	TRIC – 19	2
GLIO – 6	TRIC – 21	4
GLIO – 6	TRIC – 23	3
GLIO – 6	TRIC – 30	3
GLIO – 6	TRIC – 32	3
GLIO – 9	TRIC – 19	2
GLIO – 9	TRIC – 21	4
GLIO – 9	TRIC – 23	3
GLIO – 9	TRIC – 30	3
GLIO – 9	TRIC – 32	3
GLIO – 10	TRIC – 19	2
GLIO – 10	TRIC – 21	4
GLIO – 10	TRIC – 23	3
GLIO – 10	TRIC – 30	3
GLIO – 10	TRIC – 32	3

A avaliação visual da compatibilidade foi baseada na seguinte escala de notas:
Nota 1: O isolado de *Trichoderma harzianum* cresce sobre, aproximadamente, 75% da placa de Petri; inibe 25% o crescimento de *Gliocladium viride*.

Nota 2: O isolado de *Gliocladium viride* cresce sobre, aproximadamente, 75% da placa de Petri; inibe 25% o crescimento de *Trichoderma harzianum*.

Nota 3: *Trichoderma harzianum* cresce 50% e *Gliocladium viride*, 50% da placa de Petri.

Nota 4: Formação de halo entre as duas colônias pareadas, sem a presença de conídios.

o controle de *S. lycopersici*, *Stemphylium solani*, *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *Verticillium alboatrum*, e *Sclerotium rolfsii*. A concentração de Benomil recomendada para o controle de patógenos foliares em tomateiro é de 0,7g /L

(COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, 1999), o que equivale a 350 mg/L do ingrediente ativo.

A avaliação do crescimento micelial de *T. harzianum* e *G. viride* em meio BDA com diferentes concentrações de Benomil (Tabela 6) demonstrou que houve diferenças significativas entre os isolados quanto à resistência a esse fungicida. Os isolados GLIO – 10 e TRIC – 30, obtidos em cultivos de tomate a campo, apresentaram o maior nível de resistência ao fungida em relação aos demais isolados, cujos percentuais de redução no crescimento micelial, em concentrações de 10 mg/L do ingrediente ativo do Benomil, foram de 29,77% e 35,75%, respectivamente. Os isolados TRIC – 19 e TRIC – 32, também obtidos em cultivos de tomate à campo, apresentaram nível intermediário de resistência ao fungicida. Os percentuais de redução no crescimento, na concentração de 10 ppm, foram de 70,23% e 55,46%, respectivamente. Por outro lado, os isolados GLIO 6, GLIO 9, TRIC 21 e TRIC 23, também oriundos de cultivos de tomate sob ambiente protegido, apresentaram uma inibição de aproximadamente 50% do crescimento micelial na concentração de 2 mg/L do ingrediente ativo, e 100% na concentração de 5 mg/L. Estes resultados podem estar associados ao fato de que Benomil não é comumente recomendado para cultivos sob ambiente protegido, o que não promoveu uma pressão de seleção em favor das estirpes fúngicas resistentes, permitindo a sobrevivência das sensíveis.

Tabela 6 - Diâmetro das colônias de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* crescidas em meio BDA contendo diferentes concentrações de Benlate 500 (Ingrediente ativo: Benomil, 500g /kg).

Isolados	Concentração de Benomil (ppm)/ litro de BDA									
	0 ppm		1 ppm		2 ppm		5 ppm		10 ppm	
GLIO – 6	9,0	Aa	8,75	Aa	4,52	Eb	0	Cc	0	Dc
GLIO – 9	8,97	Aa	8,87	Aa	5,62	Db	0	Cc	0	Dc
GLIO – 10	9,0	Aa	8,95	Aa	8,85	Aa	7,52	Ab	6,32	Ac
TRIC – 19	8,97	Aa	8,70	Aa	8,52	Bb	7,67	Ac	2,67	Cd
TRIC – 21	8,97	Aa	8,77	Aa	4,60	Eb	0	Cc	0	Dc
TRIC – 23	8,95	Aa	8,80	Aa	4,05	Fb	0	Cc	0	Dc
TRIC – 30	8,95	Aa	8,82	Aa	8,80	Aa	7,52	Ab	5,75	Bc
TRIC – 32	8,87	Aa	8,77	Aa	7,67	Cb	5,65	Bc	3,95	Cd

Médias de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

A aplicação de *T. harzianum* e de *G. viride* no substrato para produção da mudas de tomateiro, conforme dados apresentados na Tabela 7, não mostrou incremento significativo para as variáveis analisadas. No experimento, as plantas estavam em condições controladas, livres de patógenos, em substrato homogêneo e com nutrientes suficientes para seu desenvolvimento. O efeito dos antagonistas sobre a emergência e o crescimento das plântulas de tomateiro não foi evidenciado, possivelmente, devido ao fato de a absorção de nutrientes ter ocorrido de forma semelhante pelas plantas tratadas com antagonistas e pelas plantas do tratamento de controle. *T. harzianum* e *G. viride* promovem o crescimento das plantas quando estas estão submetidas a algum estresse biológico ou edáfico, pois

conferem tolerância a vários fatores de estresse às plantas (HARMAN, 2000). Outro ponto a ser considerado seria que o período de ocorrência da interação entre o biocontrolador e a planta é bem maior do que 15 dias, utilizado neste trabalho, para ocasionar diferenças significativas nas variáveis analisadas. Além disso, o lote, o nível de infecção e o tipo de microrganismo presente nas sementes também poderiam afetar a eficiência do desempenho dos antagonistas (LUZ, 1993). As sementes de tomate, utilizadas neste trabalho, eram certificadas, com uma baixa incidência de patógenos que pudessem prejudicar a emergência das mesmas, o que justifica a inexistência de aumento na taxa de emergência de plântulas em relação ao tratamento de controle.

SELEÇÃO DE ANTAGONISTAS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE
Botrytis cinerea EM TOMATEIRO SOB CULTIVO PROTEGIDO

Testes *in vivo*

Tabela 7 - Efeito de isolados de *Trichoderma harzianum* e de *Gliocladium viride*, TRIC – 30 e GLIO – 10 inoculados no substrato sobre o desenvolvimento de tomateiros; médias do número de plantas emergidas após sete e dez dias; altura da parte aérea; comprimento da raiz e peso da matéria seca de 10 plantas coletadas. Eldorado do Sul, RS, 2004.

Variável analisada	Dias após plantio	Controle	<i>Trichoderma</i> TRIC – 30	<i>Gliocladium</i> GLIO – 10	TRIC+GLIO
Nºde plantas/emerg	7 dias	9,5 a	7,4 a	7,4 a	6,9 a
Nºde plantas/emerg *	15 dias	21 a	21,4 a	22,0 a	23,4 a
Altura da planta (cm)	15 dias	8,5 a	8,3 a	8,0 a	8,1 a
Medida da raiz(cm)	15 dias	2,0 a	1,60 a	1,50 a	2,19 a
Peso seco g	15 dias	0,09 a	0,08 a	0,08 a	0,09 a

* O número máximo de emergência seria 26, correspondente a todas as sementes que foram plantadas. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.

A incidência de *T. harzianum* e *G. viride*, nas radículas das plântulas de tomateiro oriundas de sementes inoculadas (Tabela 8), apresentou diferença significativa em relação ao tratamento de controle. Não foi evidenciada diferença na incidência entre os dois antagonistas em radículas, oriundas de sementes inoculadas. A desinfestação com hipoclorito de sódio a 1%, durante 2 minutos, demonstrou que os antagonistas já haviam

colonizado a maioria dos tecidos superficiais do sistema radicular, no período de 15 dias.

A incidência de *B. cinerea* na cultura do tomateiro foi observada durante todo o período de florescimento, com intensidade variável. A ocorrência de mofo cinza em flores de tomateiro variou dependendo do tratamento utilizado. A maior incidência de *B. cinerea* ocorreu no tratamento de controle.

Tabela 8 - Incidência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* nas radículas de plântulas de tomateiro.

Tratamentos	% Incidência de <i>T. harzianum</i> e <i>G. viride</i>	
t0: Nenhum tratamento com os biocontroladores;	1,32	B
t1: Inoculação de GLIO – 10 nas sementes de tomateiro;	9,5	A
t2: Inoculação de TRIC – 30 nas sementes de tomateiro;	7,75	A
t3: Inoculação simultânea de GLIO – 10 e TRIC – 30 nas sementes de tomateiro	8,75	A

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.

O teste *in vivo* utilizando isolados de *T. harzianum* e de *G. viride*, TRIC – 30 e GLIO – 10, respectivamente, sob formas diferenciadas de aplicação (Tabela 9), evidenciou a eficiência de GLIO – 10 na redução da incidência de *B. cinerea* em flores de tomateiro. Não foram observadas frutificações de *G. viride* em flores e frutos de tomateiros nas parcelas tratadas, característica que evidencia o potencial desse organismo para o controle de *B. cinerea* em tomateiros sob cultivo protegido. Os tratamentos t2 e t3, utilizando o isolado de *G. viride* GLIO – 10, apresentaram uma redução de 62%, em relação ao tratamento de controle, na incidência de *B. cinerea* em flores de tomateiros. Esse resultado foi similar ao encontrado pelo método de culturas pareadas, efetuado em laboratório, cujo percentual inibitório contra *B. cinerea* foi de 58,14%. Já no tratamento t1, que envolvia apenas aplicações no substrato, sementes e cova de plantio não ocorreu indução de resistência, uma vez que não foi eficiente para controlar o patógeno. Provavelmente, o sucesso deste antagonista foi determinado, principalmente, por sua ação antagônica direta nos órgãos mais suscetíveis ao patógeno. Logo, neste trabalho, a forma preferencial de aplicação de antagonistas, para o controle de *B. cinerea* em tomateiro sob cultivo protegido, são as pulverizações semanais a partir do florescimento.

Os tratamentos utilizando isolado de *T. harzianum*, TRIC – 30, não diferenciaram-se do tratamento controle sob nenhum modo de aplicação. Ghini e Vitti (1993) também não obtiveram controle de *B. cinerea* em morango com o uso de *T. harzianum* selecionado de solo cultivado com a cultura e efetivo na inibição do patógeno *in vitro*. Gulliano et al. (1991), comparando a utilização de *Trichoderma* spp. em controle biológico e integrado de *B. cinerea* em tomate, observaram que *Trichoderma* spp. sozinho, usado em pulverizações foliares, não apresentou controle consistente da doença. No entanto, obteve controle completo da doença e redução, acima de 50%, do número de aplicações, quando utilizou a mistura de dicarboximida + thiram ou a alternância dessa mistura com *Trichoderma* spp. Em trabalhos posteriores, esses autores aplicaram simultaneamente isolados de *Trichoderma* spp. (com resistência ao fungicida) e Benomil e obtiveram um controle promissor. Elad e Shitienberg (1996) também demonstraram a efetividade de *T. harzianum* em adição a fungicidas no controle de *B. cinerea* em pepino. O isolado selecionado neste trabalho também pode ter efeito sob *B. cinerea*, quando utilizado em controle integrado, uma vez que apresenta, dentre os demais testados, bom nível de resistência a este fungicida. Outra possibilidade para aumentar a eficiência do isolado de *T. harzianum* seria o enriquecimento

Tabela 9 - Efeito dos tratamentos com isolados de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride*, TRIC – 30 e GLIO– 10, na incidência de *Botrytis cinerea* em flores de tomateiro. Eldorado do Sul, RS. 2005.

Tratamentos	Botões florais necrosados por <i>B. cinerea</i>
Testemunha	12,29 a
<i>Gliocladium viride</i> (t1)	9,542 a
<i>Gliocladium viride</i> (t2)	4,717 b
<i>Gliocladium viride</i> (t3)	4,708 b
<i>Trichoderma harzianum</i> (t1)	11,92 a
<i>Trichoderma harzianum</i> (t2)	11,13 a
<i>Trichoderma harzianum</i> (t3)	11,50 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%.

Testemunha: Nenhum tratamento com os biocontroladores.

Gliocladium viride (t1): Biocontrolador no substrato, semente e cova (plântio); *Gliocladium viride* (t2): Biocontrolador apenas em pulverizações foliares semanais 7 dias após o plantio.

Gliocladium viride (t3): Biocontrolador no substrato, semente, cova (plântio) e nas pulverizações foliares.

Trichoderma harzianum (t1): Biocontrolador no substrato, semente e cova (plântio).

Trichoderma harzianum (t2): Biocontrolador apenas em pulverizações foliares semanais 7 dias após o plantio.

Trichoderma harzianum (t3): Biocontrolador no substrato, semente, cova (plântio) e nas pulverizações foliares;

do filoplano com nutrientes, que, além de agir diretamente sobre as microbiotas antagonista e patogênica, pode incitar mudanças no próprio hospedeiro.

A utilização de *G. viride* para o controle de *B. cinerea* em tomateiros sob cultivo protegido, de acordo com os

resultados deste trabalho, apresenta grande potencial para tornar-se importante alternativa para os produtores de tomates em estufas, uma vez que *B. cinerea* adquire resistência a fungicidas com maior frequência nestas condições de ambiente.

Referências

- ANDREWS, J. H. Biological Control in Phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology**, Davis, v. 30, p. 603-635, 1992.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* Antagonism of *Trichoderma* Species Against Six Fungal Plant Pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v.72, p. 370-382, 1982.
- COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS: Guia Prático de Produtos Fitossanitários para Uso Agrícola. 6. ed. Cidade: Andrei, 1999.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of Soil Fungi**. London: Academic Press, 1980. 630 p.
- ELAD, Y.; SHITINBERG, D. *Trichoderma harzianum* T39 (Trichodex) Integrated With Fungicides for the Control of Grey Mould of Strawberry, Vegetable Greenhouse-Crops and Grapes. In: WENHUA, T.; COOK, R. S.; ROVIRA, A. (Eds). **Advances in Biological Control of Plant Diseases**, p.310-319, 1996.
- ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; DA SILVA, A. C. F.; STEFANO, D. R.; DA ROCHA, E. K. Fungos Antagonistas a Sclerotinia sclerotiorum em Pepineiro Cultivado em Estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 127-133, 2005.
- FOKKEMA, N. J. Perspectives for Biocontrol of Diseases Affecting Aerial Plant Surfaces. In: CONGRESSO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGIA, 8., 1996. Córdoba: Sociedad Española de Fitopatología, 1996. p. 237-239.
- GHINI, R. Ocorrência de Resistência em Linhagens de *Botrytis cinerea*, no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 285-288, 1996.
- GHINI, R.; VITTI, A. J. Controle Integrado de *Botrytis cinerea* na Cultura do Morango. **Summa Phytopathology**, Jaboticabal, v. 19, p. 10-13, 1993.
- GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; DINOOR, A. Combining Biocontrol Agents to Reduce the Variability of Biological Control. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, p.621-627. 2001.
- GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; FISCHER, E.; DINOOR, A. Improving Biological Control by Combining Biocontrol Agents Each with Several Mechanisms of Disease Suppression. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, p.976-985. 2002.
- GULLIANO, M. L.; ALOI, C.; BENZI, D.; GARIBALDI, A. Biological and Integrated Control of Grey Mold of Vegetal Crops. In: INTERNATIONAL TRICHODERMA AND GLIOCLADIUM WORKSHOP, 4., 1991. Belgrate: Torino University, 1991. p. 149. Abstr.
- HARMAN, G. E. Myths and Dogmas of Biocontrol. **Plant Disease**, St. Paul, v.84, n.4, 2000.
- KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma harzianum*: Interaction with Plants and Effect on Growth Response. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 144, n.2, p.267-272, 1992.
- KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. *et al.* **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1997. v. 2.
- LUZ, W. C. Microbiolização de Sementes para o Controle de Doenças de Plantas. **Revisão Anual de Fitopatologia**, Passo Fundo, v.1, p.33-77, 1993.
- MARIANO, R. L. R. Métodos de Seleção “in vitro” para Controle Microbiológico. **Revisão Anual de Fitopatologia**, Passo Fundo, v. 1. p. 360-409, 1993.
- MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como Bioprotetores de Plantas. **Revisão Anual de Fitopatologia**, Passo Fundo, v. 4, p. 261-295, 1996.
- UTKHEDE, R.; BOGDANOFF, C.; McNEVIN, J. Effects of Biological and Chemical Treatments on Botrytis Stem Canker and Fruit Yield of Tomato Under Greenhouse Conditions. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v.23, p. 253-259, 2001.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; SUTTON, J. C.; PERAZZOLO, I.; CZERMAINSKI, A. B. C. Biocontrole de *Botrytis cinerea* em Morangueiros Cultivados em Estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p.362, 1995. Abstr.
- ZIMAND, G.; ELAD, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* Pathogenicity. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, p.1255-1260, 1996.