



MULTIPLICAÇÃO E FORMULAÇÃO DE *Clonostachys rosea* PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE MOFO-CINZENTO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL EM TOMATE

Elisa Góis do **Paraíso**¹; Wagner **Bettiol**²; Gabriel Moura **Mascarin**³

Nº 22404

RESUMO – O fungo *Clonostachys rosea* possui capacidade de suprimir uma ampla gama de fitopatógenos fúngicos, entre eles *Botrytis cinerea*, agente causal do mofo-cinzento em tomate, podendo agir também como promotor de crescimento de plantas. No Brasil, só existe um produto comercial à base de *C. rosea* e há carência de estudos sobre fermentação líquida submersa e formulação adequada para esse agente de biocontrole. Nesta pesquisa, investigamos o efeito da aeração em culturas líquidas de *C. rosea* para produção tanto de conídios submersos quanto de microescleródios, seguido da formulação desses propágulos em microgrânulos dispersíveis em água. A eficácia de controle de mofo-cinzento em frutos de tomate foi determinada tanto para o caldo fermentado filtrado (isento de biomassa) como para formulações de propágulos de *C. rosea*, enquanto que no estudo sobre a promoção de crescimento de plantas de tomate apenas os propágulos formulados foram testados. A aeração influenciou significativamente a produção de propágulos de *C. rosea*, com incrementos mais expressivos para microescleródios do que para conídios submersos. Conídios submersos e microescleródios de *C. rosea*, bem como seu caldo filtrado diminuíram a incidência do mofo-cinzento em frutos de tomate. Entretanto, essa cepa de *C. rosea* não apresentou efeito promotor de crescimento em plantas de tomate em condições de casa-de-vegetação. Os resultados obtidos demonstram a importância da aeração na fermentação líquida de *C. rosea* e revelam a ação antagônica de propágulos submersos e do seu caldo fermentado no controle de mofo-cinzento em frutos de tomate.

Palavras-chaves: Bioinsumos, Cultivo líquido submerso, Fungicida biológico, *Solanum lycopersicum*, doenças de pós-colheita.

ABSTRACT – The fungus *Clonostachys rosea*, has the ability to suppress a wide range of fungal pathogens, including *Botrytis cinerea*, the causal agent of tomato powdery mildew, and can also act

¹ Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia Agrônoma, UNESP, Jaboticabal-SP; elisa.gois@unesp.br

² PhD, Pesquisador Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; wagner.bettiol@embrapa.br

³ Orientador: PhD, Analista de pesquisa da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; gabriel.mascarin@embrapa.br.



*as a biostimulant in plants. In Brazil, there is only one commercial product based on *C. rosea* and there is a lack of studies on submerged liquid fermentation and the appropriate formulation for this biocontrol agent. In this research, we investigated the effect of aeration on liquid cultures of *C. rosea* for production of both submerged conidia and microsclerotia, followed by formulation of these propagules into water-dispersible microgranules. The control efficacy of grey mold in tomato fruits was determined for both filtered fermented broth (free of biomass) and formulated *C. rosea* propagules, while in the study on growth promotion of tomato plants only the formulated propagules were tested. Aeration significantly influenced the production of *C. rosea* propagules, with more significant increases for microsclerotia than for submerged conidia. Submerged conidia and microsclerotia of *C. rosea*, as well as its filtered broth, decreased the incidence of grey mold on tomato fruit. However, this strain of *C. rosea* showed no growth promoting effect on tomato plants under greenhouse conditions. The results obtained demonstrate the importance of aeration in the liquid fermentation of *C. rosea* and reveal the antagonistic action of submerged propagules and their fermented broth in the control of tomato fruit powdery mildew.*

Keywords: Bioinsuamentos, Submerged liquid culture, Biological fungicide, *Solanum lycopersicum*, post-harvest diseases.

1. INTRODUÇÃO

A alta demanda por uma agricultura sustentável, com uso de produtos químicos cada vez menor, tornou o controle biológico uma estratégia de alta tecnologia no campo e cada vez mais demandada pelos agricultores. O mercado de bioinsumos cresceu em média 14,4% ao ano no âmbito mundial e 70% no mercado nacional (MAPA, 2019). A demanda pelo controle biológico aumentou em virtude da mudança no paradigma de controle de doenças de plantas nos últimos anos. Antes, o objetivo era erradicar totalmente os patógenos com adoção de produtos químicos, o que acarretou na seleção de isolados dos patógenos resistentes aos principais princípios ativos. Além disso, causou a ocorrência de surtos de doenças consideradas como secundárias, redução de microrganismos benéficos, além de danos à saúde do homem, animais e poluição ambiental, com o acúmulo de resíduos no solo, na água e nos alimentos (MELO; AZEVEDO, 1998; SARAIVA, 2009).

O fungo saprofítico e não patogênico *Clonostachys rosea* produz conídios unicelulares em conidióforos de dois tipos, penicilado e verticilado, e é encontrado em diversos tipos de solos e restos culturais (SARAIVA, 2009). Este fungo é considerado um agente de alta eficiência no controle biológico de fungos fitopatogênicos, tais como *Botrytis cinerea*, agente causal do mofo-cinzento em



tomate e outras culturas vegetais, além de apresentar ação inseticida sobre alguns insetos-praga, como a mosca-branca (*Bemisia tabaci*) (MASCARIN *et al.*, 2022), e ação nematicida sobre *Meloidogyne incognita* (CRISTÓBAL-ALEJO *et al.*, 2021). Sobretudo, esse fungo benéfico pode induzir a resistência sistêmica e promover o crescimento de plantas (MACEDO, 2011).

Para a comercialização viável de microrganismos, a escolha da forma de produção, a composição e as condições abióticas ótimas para crescimento no meio de cultivo, o armazenamento apropriado do microrganismo e a demonstração da ausência de riscos tanto ambientais quanto no manuseio do agente microbiano são cruciais para seu sucesso como biopesticida (ELAD; STEWART, 2004). A produção massal de fungos para biocontrole pode ocorrer por fermentação sólida, líquida ou bifásica, e o objetivo dessas técnicas de produção é conseguir a maior quantidade de propágulos eficazes no menor período de tempo (SARAIVA, 2009).

A fermentação líquida submersa se mostra mais viável que a fermentação sólida-estática. A fermentação líquida é mais vantajosa para a indústria, pois permite maior controle de relação C:N, pH, oxigenação, atividade de água, temperatura, níveis de nutrientes, entre outros fatores. Desta forma, permite produzir grandes quantidades de conídios submersos de forma rápida, com baixo risco de contaminação (MASCARIN *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2018). Além de estimular a formação de conídios submersos, a fermentação líquida permite a produção de outras estruturas de resistência, como os microescleródios, além de inúmeros metabólitos secundários bioativos que também exercem papel importante no biocontrole de organismos-alvo (MAGANHOTO, 2020).

O presente estudo buscou otimizar a taxa de aeração durante o cultivo submerso de *C. rosea* cepa LQC-62 para maximizar a produção de conídios submersos e microescleródios, determinar a bioeficácia desses propágulos contra *B. cinerea* em frutos de tomate sob condições de laboratório, bem como avaliar seu efeito sobre o crescimento de plantas de tomate em casa de vegetação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolado e manutenção da cultura

Neste estudo os organismos utilizados foram os fungos *C. rosea* cepa LQC-62, proveniente da Coleção da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, Brasil e *B. cinerea* cepa Bc 39, oriundo da empresa Sakata Seed Sudamérica, Bragança Paulista, SP, Brasil. Para a manutenção de *C. rosea*, foi realizada a multiplicação em meio sólido com grãos de arroz em BDA, mantidos em BOD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com 12h de fotofase por sete dias. O patógeno *B. cinerea* foi cultivado em BDA contendo folhas



de tomate trituradas no meio e mantido em sala de incubação com 12h de fotofase em luz negra a 25°C para crescimento e esporulação.

2.2. Fermentação líquida submersa com diferentes taxas de aeração

Neste ensaio, o objetivo foi investigar o efeito da interação da taxa de aeração com a razão C:N sobre a morfogênese e rendimento na produção de conídios submersos e microescleródios de *C. rosea* sob cultivo líquido submerso. A taxa de aeração foi caracterizada em dois níveis com base na razão de superfície/volume: elevada aeração representada por 1/5 do volume do frasco preenchido com meio líquido (50 mL/250 mL), e baixa aeração dada pela razão de 1:2,5 (100 mL/250 mL). As duas relações C:N testadas foram de 50:1 e 10:1, mantendo-se constante o teor total de carbono nos tratamentos igual a 36 g de C/L. O ensaio seguiu um delineamento inteiramente casualizado com nove repetições por tratamento (3 experimentos x 3 repetições por tratamento x 4 tratamentos). Os meios líquidos foram inoculados com uma pré-cultura líquida, a qual, por sua vez, foi preparada mediante a raspagem de conídios produzidos em meio BDA após 14 dias de incubação. A suspensão de conídios foi preparada com 10 mL de solução esterilizada de surfactante Tween® 80 a 0,04%. A pré-cultura recebeu 5 mL dessa suspensão fúngica contendo 5×10^7 conídios/mL nos frascos de Erlenmeyer tipo *baffled* preenchidos com 45 mL de meio líquido, e o qual teve pH inicial ajustado para 6. Essa pré-cultura líquida permaneceu quatro dias na incubadora shaker com agitação orbital (248 rpm, diâmetro orbital de 28 mm, Solab®) a 28 °C e 12:12h de fotoperíodo.

A inoculação dos meios de cultura líquidos foi feita com a pré-cultura líquida, transferindo-se 10 mL de inóculo da suspensão de conídios submersos aos frascos contendo 90 mL de meio líquido, obtendo-se o tratamento com 100 mL de meio classificado como “baixa aeração”. O outro tratamento com aeração mais “elevada” consistiu em 50 mL de meio por frasco, onde se adicionou 5 mL de inóculo oriundo da pré-cultura em 45 mL de meio líquido. Essas culturas foram mantidas em incubadora tipo shaker orbital (248 rpm) a 28 °C e fotoperíodo de 12:12h por quatro dias. Para determinar a concentração de conídios submersos, uma alíquota de 1 mL de cultura líquida foi retirada dos frascos e diluída sucessivamente para contagem em câmara de Neubauer. Para a quantificação de microescleródios, uma amostra de 1 mL da cultura líquida foi coletada de cada frasco e diluída a 10^{-1} e, em seguida, uma alíquota de 100 μ L dessa diluição foi transferida para câmara de Neubauer para contagem somente de microescleródios. Os resultados foram expressos em conídios submersos/mL e microescleródios/mL após 2, 3 e 4 dias de fermentação. A composição nutricional do meio de cultura foi a de Mascarin *et al.* (2022) (Tabela 1), tendo relação C:N de 10:1 para formação de microescleródios e relação C:N de 50:1 favorável à formação de conídios. A



densidade inicial de inóculo utilizada nesses experimentos de fermentação líquida foi de 5×10^6 conídios/mL de meio líquido (proveniente da pré-cultura).

Para a produção e secagem de biomassa, os produtos obtidos no ensaio de fermentação líquida foram centrifugados por 20 minutos, a 10.000 rpm e 10 °C. Os sobrenadantes gerados, livres de biomassa fúngica, foram preservados em freezer a -20 °C até o uso no bioensaio com *B. cinerea*. A determinação dos propágulos viáveis foi realizada através da metodologia de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Após diluição seriada das amostras obtidas na fermentação líquida, transferiu-se para o meio uma alíquota de 50 µL da suspensão de *C. rosea* da diluição de 10^{-7} . As placas foram incubadas por quatro dias em BOD a $25 \pm 0,5$ °C com fotoperíodo de 12:12h até o aparecimento de colônias para contagem do número de UFC.

A determinação da produção de conídios por grama de microgrânulos, após a secagem da biomassa, foi realizada pela técnica de *sprinkle* (MASCARIN *et al.*, 2022). Para tanto, 0,03 g de microgrânulos, provenientes das culturas com alta e baixa aeração, foi distribuído sobre toda a superfície do meio ágar-água em placa de Petri e incubados por sete dias a $25 \pm 0,5$ °C com fotoperíodo de 12:12h. Logo após a esporulação, a produção de conídios por grama de microgrânulos foi determinada em câmara de Neubauer.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura líquida utilizados na fermentação de *Clonostachys rosea* com menor e maior taxa de aeração.

Ingredientes	Pré-cultura	T1	T2	T3	T4
Relação C:N	-	10:1	50:1	10:1	50:1
pH inicial	6	6	6	6	6
Inóculo 5×10^7 (mL)	5	5	5	10	10
Meio Basal (mL)	25	25	25	50	50
Dextrose 25% (mL)	18,6	7,7	18	15,4	36
H ₂ O Destilada (mL)	1,05	12,3	2	24,6	4
Extrato de Levedura (g)	0,35	-	-	-	-
Baker's soyflour (g)	-	2,12	0,42	4,25	0,84
Volume total (mL)	50	50	50	100	100

2.3. Bioensaio de *C. rosea* vs. *B. cinerea*

O bioensaio de parasitismo de *C. rosea* sobre escleródios de *B. cinerea* foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 8 tratamentos e 22 amostras (2 ensaios com 11 repetições por tratamento cada), sendo testados: T1= controle apenas com água destilada; T2= suspensão de conídios de *B. cinerea* na concentração 5×10^6 conídios/ml (controle positivo); T3= suspensão de conídios de *C. rosea* da fermentação líquida (meio T2, Tabela 1) a 1×10^8 conídios



/mL; T4= suspensão de microescleródios de *C. rosea* da fermentação líquida (meio T1, Tabela 1) na concentração 1×10^4 MS/mL; T5 = sobrenadante filtrado; T6= suspensão de conídios de *C. rosea* da fermentação líquida (meio T2, Tabela 1) a 1×10^8 conídios /mL, mais suspensão de conídios do *B. cinerea* na concentração 5×10^6 conídios /mL; T7= suspensão de microescleródios de *C. rosea* da fermentação líquida (meio T1 Tabela 1) na concentração 1×10^4 MS/mL, mais suspensão de conídios do *B. cinerea* na concentração 5×10^6 conídios /mL; T8= sobrenadante filtrado, mais suspensão de conídios do *B. cinerea* na concentração 5×10^6 conídios /mL. A execução do processo de aplicação do experimento durou um período de 2 dias.

Para a preparação da suspensão de *B. cinerea*, foi raspada uma placa deste fungo em 10 mL de solução de Tween® 80 a 0,04%, em seguida, realizou-se a diluição seriada para contagem de esporos na câmara de Neubauer. Desta forma, foi inoculado 0,22 mL dessa suspensão com concentração de inóculo de 1×10^8 conídios/mL em um frasco contendo 39,78 mL de Tween® 80 a 0,1% suplementado com 4% de sacarose (a sacarose é necessária para estimular a germinação dos conídios deste fitopatógeno). Foram utilizados frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) da variedade Sweet Grape e marca comercial La Vita. Os tomates foram desinfestados superficialmente por imersão em uma solução de hipoclorito 1% por 60 segundos e enxaguados por 60 segundos em água destilada, em seguida, secos em câmara de fluxo sobre papel toalha autoclavado. Após a desinfestação superficial, os frutos foram colocados em potes plásticos de 250 mL com tampa e cuja base foi forrada com papel toalha estéril e umedecido com 1,5 mL de água destilada esterilizada. Para a inoculação dos fungos, realizaram-se, previamente, dois cortes no epicarpo do fruto com 5 mm de profundidade, utilizando-se uma lâmina de bisturi modelo 21. Em seguida, foram aplicados nos cortes de cada fruto: a) 15 µL de água destilada estéril no tratamento controle absoluto, b) 15 µL da suspensão de conídios de *C. rosea* no T3 e T6, c) 15 µL da suspensão de microescleródios de *C. rosea* no T4 e T7, e d) 15 µL de sobrenadante do caldo fermentado do fungo no T5 e T8, para a simulação de um tratamento preventivo. Após 24h de tratados, inocularam-se 15 µL de conídios de *B. cinerea* (5×10^6 conídios/mL) nos mesmos ferimentos (cortes) nos tratamentos T2, T6, T7 e T8. Os tratamentos foram mantidos em BOD a 25 °C e 12h de fotofase. A primeira avaliação foi realizada após cinco dias incubação e a segunda após sete dias, observando-se o crescimento dos fungos nos frutos de tomate, e aparecimento de sintomas de mofo-cinzento nas lesões inoculadas nos tomates. Avaliou-se a incidência da doença pelo diagnóstico visual computando-se a presença ou ausência de sintoma de mofo-cinzento nos frutos.

2.4. Promoção de crescimento em plantas de tomate



O experimento foi conduzido na casa de vegetação com tomateiros da variedade Santa Clara, disponibilizado pela empresa Sakata Seed Sudamérica, por 75 dias após o transplante. Foram utilizados vasos de 3 L contendo substrato Multiplant 1075 e submetidos à regime de irrigação por gotejamento, que foi ajustada a cada fase da planta. Durante o experimento foram aplicados mensalmente 4 g do adubo 18-6-12 NPK da marca Apex Nursery Fertilizer por planta. Foram feitas três aplicações de *C. rosea* por planta, a primeira ocorreu no momento do transplante das mudas de tomate, a segunda após 15 dias do transplante e a última após 25 dias do transplante. Os seguintes tratamentos foram estudados: T1= Controle absoluto (água estéril); T2= Conídios de *C. rosea* na concentração de 2×10^7 conídios/mL; T3= Conídios de *C. rosea* na concentração de 2×10^8 conídios / mL; T4= Microescleródios de *C. rosea* na concentração de 2×10^3 MS/mL; T5= Microescleródios de *C. rosea* na concentração de 2×10^4 MS/mL, com 8 repetições em delineamento inteiramente casualizado. As aplicações do *C. rosea* obtidos na fermentação líquida (T1 e T2, Tabela 1) foram calculadas de acordo com a concentração de cada tratamento e diluídas em água esterilizada. A inoculação foi realizada ao redor do colo da planta a 2 cm da superfície com uma pipeta esterilizada de 10 mL. Após a inoculação as plantas foram irrigadas. Na colheita das plantas, realizada na parte da manhã para todas as parcelas, foram avaliadas as massas frescas da parte aérea e do sistema radicular (g por planta). Após a separação da parte aérea da raiz, cada parte foi imediatamente pesada separadamente. As folhas e o caule foram acondicionados em sacos de papel e secos em estufa de circulação forçada de ar a 65 ± 5 °C, até atingir pesos constantes, obtendo-se a massa seca da parte aérea (g por planta). Para obtenção da massa seca da raiz (g por planta) foi adotado o mesmo procedimento descrito para determinar a massa seca de folhas e caule.

2.5 Análise dos dados

Os dados de produção de conídios aéreos por microgrânulos de microescleródios, conídios submersos e microescleródios foram ajustados separadamente com modelos lineares mistos (variável aleatória atribuída à repetição do frasco) e não-mistos com distribuição normal, com ou sem interação dos efeitos fixos no preditor linear. Os dados de ocorrência de mofo-cinza em frutos de tomate foram ajustados com um modelo linear generalizado e distribuição binomial com função de ligação logística. Os dados fitotécnicos de crescimento de plantas foram ajustados a um modelo linear geral e depois submetidos à ANOVA, sem transformação prévia dos dados. Quando houve efeito significativo de tratamentos e suas interações, as médias foram comparadas pelo método de Tukey HSD a $P < 0,05$. As análises foram realizadas no ambiente estatístico R (<https://cran.r-project.org/>).



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Influência da taxa de aeração na fermentação líquida de *C. rosea*

A interação de tempo de cultivo com taxa de aeração influenciou significativamente a produção de conídios submersos de *C. rosea* ($F = 3,17$, $gl = 2, 75$, $P = 0,048$). A elevação da aeração com volume de 50 mL de meio de cultura resultou em maior produção desses propágulos no quarto dia de fermentação e no meio com relação C:N de 50:1 (atingindo $1,31 \times 10^9$ conídios submersos/mL), quando comparada à taxa de aeração inferior no meio com 100 mL (Figura 1A). Outro ponto importante para maximizar a produção de conídios submersos foi a combinação de uma elevada taxa de aeração e alta relação C:N ($F = 6,47$, $gl = 2, 77$, $P = 0,013$). É interessante notar que, independentemente da taxa de aeração e do tempo de fermentação, a concentração desses conídios submersos foi sempre superior quando o fungo foi cultivado em meio com relação C:N de 50:1 e com incrementos significativos ao longo do tempo de cultivo ($F = 22,95$, $gl = 2, 74$, $P < 0,0001$), o que corrobora com os resultados anteriores de nossas pesquisas (MASCARIN *et al.*, 2022). Era esperado que o incremento na taxa de aeração na cultura líquida conferisse um efeito direto de aumento na produção de conídios submersos, porém os resultados apontam que esse efeito da taxa de aeração para conídios submersos foi menos expressivo do que na formação de microescleródios.

O meio com C:N de 50:1 não induziu a formação de microescleródios de *C. rosea*, comprovando nossos resultados prévios (MASCARIN *et al.*, 2022). Entretanto, no meio com C:N de 10:1, onde há maior teor de nitrogênio total, ocorreu formação e elevada concentração de microescleródios desse fungo. Quando houve incremento da aeração mediante redução do volume do meio no frasco pela metade do usual, ocorre um aumento significativo na produção de microescleródios ($F = 50,41$, $gl = 1,24$, $P < 0,0001$), sendo que não houve diferença nas concentrações deste propágulo entre o terceiro e o quarto dia de fermentação ($F = 2,19$, $gl = 1, 24$, $P = 0,15$, Figura 1B). As maiores concentrações de microescleródios atingiram $1,5 \times 10^3$ e $2,2 \times 10^3$ MS/mL nos dias 3 e 4 de fermentação, respectivamente, superando em 29 e 27 vezes aquelas concentrações obtidas com baixa aeração em 100 mL de meio. Logo, a produção de microescleródios foi maximizada em meios com relação C:N de 10:1 sob elevada aeração e no terceiro dia de cultivo.

A produção de conídios aéreos via esporogênese de microgrânulos secos contendo microescleródios (provenientes do meio com relação C:N de 10:1) e submetidos à re-hidratação por sete dias foi significativamente incrementada com microescleródios produzidos a partir de culturas líquidas com alta taxa de aeração (50 mL de meio) ($F = 23,81$, $gl = 1,16$, $P = 0,00017$, Figura 1C). A produção de conídios aéreos atingiu uma média de $1,22 \times 10^{10}/g$ na formulação feita com culturas

de 50 mL contra uma média de $1,73 \times 10^9/g$ da formulação oriunda de culturas de 100 mL. Esse resultado pode estar relacionado ao maior número de microescleródios encontrados por microgrânulos quando formulados com o meio de 50 mL em comparação ao meio com 100 mL.

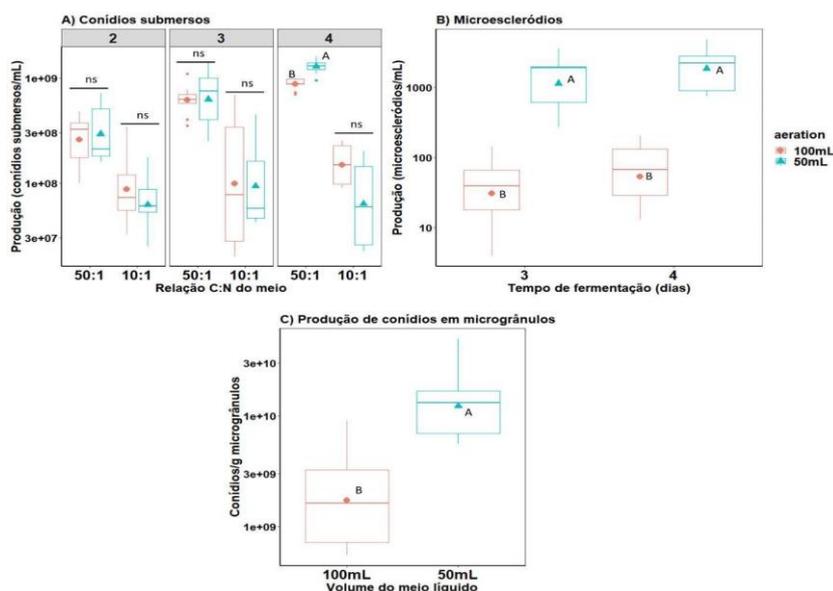


Figura 1. Efeito da taxa de aeração na produção de conídios submersos (A) e microescleródios (B) de *C. rosea* sob cultivo líquido submerso em frascos agitados. Produção de conídios aéreos por *C. rosea* após esporulação de microgrânulos de microescleródios re-hidratados por sete dias em meio ágar-água (C). Médias seguidas por letras distintas indicam diferenças significativas entre tratamentos (Tukey HSD, $P < 0,05$).

3.2. Controle de mofo-cinzento em frutos de tomate

No quinto dia de avaliação, observou-se efeito significativo dos tratamentos com propágulos e o caldo filtrado de *C. rosea* na redução da incidência de mofo-cinzento em frutos de tomate ($\chi^2 = 31.80$, $gl = 3$, $P < 0,0001$). No tratamento controle, apenas inoculado com *B. cinerea*, foi observada a ocorrência, em média, de 79% de lesões com presença do mofo-cinzento e um aspecto de apodrecimento. Nos frutos de tomate que foram tratados previamente com propágulos ou o caldo filtrado de *C. rosea*, a incidência de mofo-cinzento foi reduzida entre 50% e 72% (Figura 2A). No sétimo dia de avaliação, houve novamente efeito significativo dos tratamentos com propágulos e o caldo filtrado de *C. rosea*, promovendo proteção de frutos de tomate contra infecção por *B. cinerea* ($\chi^2 = 37.54$, $gl = 3$, $P < 0,0001$, Figura 2B). Tomates inoculados apenas com *B. cinerea* apresentaram em média 85% de lesões com presença do mofo-cinzento, enquanto os tomates previamente tratados com propágulos ou o caldo filtrado de *C. rosea* tiveram baixa incidência de mofo-cinzento, resultando em supressão da doença em 53% a 72%. Nos tratamentos somente com inoculação das

lesões com *C. rosea*, na ausência de *B. cinerea*, houve leve colonização superficial por esse fungo benéfico sem causar qualquer tipo de dano ao fruto de tomate. Enquanto a aplicação do caldo fermentado filtrado de *C. rosea* manteve as lesões intactas e sem crescimento de patógenos (Figuras 3 e 4). Em tomates do controle absoluto inoculados somente com água destilada estéril, não houve qualquer incidência de patógenos, demonstrando a assepsia e cuidados durante a manipulação experimental dos tomates.

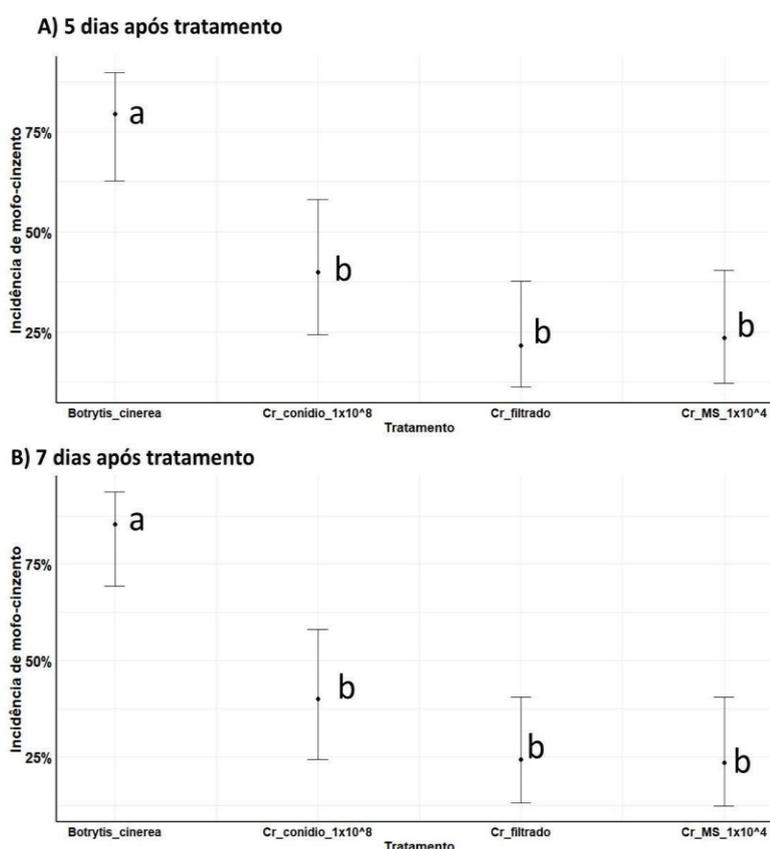


Figura 2. Atividade antagônica de *Clonostachys rosea* sobre a incidência de mofo-cinzento causado por *Botrytis cinerea* em frutos de tomate no quinto (A) e sétimo (B) dia de avaliação. Médias seguidas por letras distintas indicam diferenças significativas entre tratamentos (Tukey HSD, $P < 0,05$).

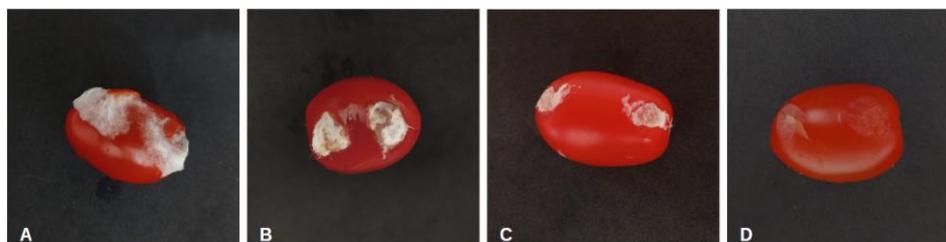


Figura 3. Frutos de tomate após tratamento com *Clonostachys rosea* na presença de *Botrytis cinerea* no quinto dia de avaliação. (A) Fruto somente com *B. cinerea*, (B) fruto com *B. cinerea* e *C. rosea* (Conídio), (C) fruto com *B. cinerea* e *C. rosea* (Microescleródio), (D) fruto com *B. cinerea* e *C. rosea* (Filtrado).

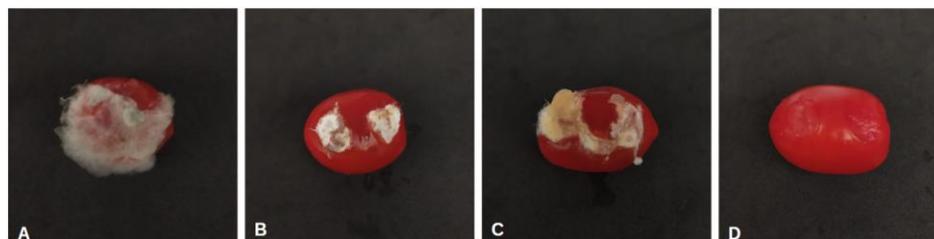


Figura 4. Frutos de tomate após tratamento com *Clonostachys rosea* na presença de *Botrytis cinerea* no sétimo dia de avaliação. (A) Fruto somente com *B. cinerea*, (B) fruto com *B. cinerea* e *C. rosea* (Conídio), (C) fruto com *B. cinerea* e *C. rosea* (Microescleródio), (D) fruto com *B. cinerea* e *C. rosea* (Filtrado).

3.3. Efeito de *C. rosea* no crescimento de plantas de tomate

O fungo *C. rosea* nas concentrações aplicadas não influenciou as massas fresca e seca da parte aérea, tampouco a massa seca do sistema radicular (Figura 5). Esses resultados são divergentes dos obtidos por Macedo (2011), que observou aumento das matérias secas da parte aérea e do sistema radicular promovido por *C. rosea* em plantas inoculadas de tomate, margarida, eucalipto e soja. Cepas de *C. rosea* melhoraram a sanidade de mudas de *Pinus radiata* e contribuem positivamente para o seu crescimento e melhorando a qualidade de raízes e, por conseguinte, no aumento do volume radicular (MORAGA-SUAZO; SANFUENTES, 2017).

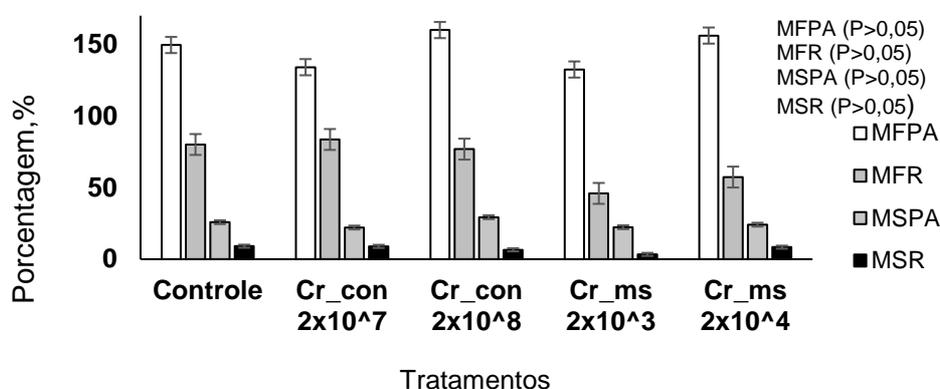


Figura 5. Influência de *Clonostachys rosea* no crescimento de planta de tomate em casa-de-vegetação. Barras verticais (erro-padrão) representam as médias de: massa fresca parte aérea (MFPA), massa fresca da raiz (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de plantas de tomate com ou sem a aplicação de propágulos de *C. rosea*. Legenda: “ms” = microescleródios e “con” = conídios submersos. Médias de tratamentos não foram significativas para as variáveis analisadas (ANOVA, $P > 0,05$).

4. CONCLUSÃO

O incremento da taxa de aeração aumentou a produção de propágulos de *C. rosea* sob cultivo submerso, com maior expressão na produção de microescleródios do que em conídios submersos. Conídios submersos e/ou microescleródios de *C. rosea*, bem como seu caldo filtrado, reduziram a incidência de mofo-cinzento em frutos de tomate. O isolado de *C. rosea* (LQC-62) não apresentou efeito promotor de crescimento em plantas de tomate sob condições de casa-de-vegetação.



5. AGRADECIMENTOS

Elisa Góis do Paraíso agradece ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq 122864/2021-2) e à Embrapa Meio Ambiente (SEG: 30.20.90.009.00.02.004), pela oportunidade de desenvolvimento da Iniciação Científica. Wagner Bettiol agradece ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa (CNPq 307855/2019-8). Agradecemos também à empresa Sakata Seed Sudamérica pelo fornecimento das sementes de tomate e do isolado de *B. cinerea* utilizados neste estudo.

6. REFERÊNCIAS

- CARVALHO, A. L. A. *et al.* Optimizing the mass production of *Clonostachys rosea* by liquid-state fermentation. **Biology Control**, v. 118, p. 16-25, 2018.
- CRISTÓBAL-ALEJO, J. *et al.* *Clonostachys rosea* selected by nematicidal screening and its efficacy against *Meloidogyne incognita* in a greenhouse. **Biocontrol Science and Technology**, v. 15, n. 2, p. 1-15, jun. 2021.
- ELAD, Y.; STEWART. A microbial control of botrytis. In: ELAD, Y. *et al.* **Botrytis: biology, pathology and control**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. p. 223-236.
- MACEDO, P. E. F. **Promoção do crescimento de plantas mediada por *Clonostachys rosea***. 2011. 36 f. Dissertação (Mestrado em fitopatologia)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MAGANHOTO, N. H. **Otimização dos parâmetros para fermentação líquida submersa de *Clonostachys rosea***. 2020. 78 f. Dissertação (Mestrado em fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- MAPA. **Mercado de biodefensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano**: comportamento segue tendência mundial de redução do uso de agroquímicos para combater pragas e doenças nas lavouras. Rio de Janeiro, 10 abr. 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil>>. Acesso em: 02 maio de 2022.
- MASCARIN, G. M. *et al.* Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and bioefficacy of blastospores. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 16, p. 6653–6665, 2015.
- MASCARIN, G. M. *et al.* *Clonostachys rosea*: Production by Submerged Culture and Bioactivity Against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Bemisia tabaci*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 851000, 2022.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. de. (ed). **Controle Biológico**. Jaguariúna, SP, Embrapa, 1998. 262p. 1998. v. 1.
- MORAGA-SUAZO, P.; SANFUENTES, E. Growth promotion of *Pinus radiata* seedlings by soil inoculation and seed pretreatment with the biological control agent *Clonostachys rosea*. **Gayana Botanica**, v. 1, n. 74, p. 1-7, 2017.
- SARAIVA, R. M. **Produção Massal de *Clonostachys rosea***. 2009. 45 f. Dissertação (Mestrado em fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.