

Associação de lodo de esgoto e *Clonostachys rosea* para a supressão de *Botrytis cinerea* em restos culturais de roseira

Marcelo A.B. Morandi¹, Elen R. Santos¹, Liliana P.V. Mattos², Rafaella C. Bonugli³

¹Embrapa Meio Ambiente, CP 69, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP., Brasil, e-mail: mmorandi@cnpm.br. ²Bolsista de Treinamento Técnico, FAPESP. ³Bolsista de Iniciação Científica, FAPESP.

Data de chegada: 04/10/2004. Aceito para publicação em: 26/04/2005.

Autor(a) para correspondência: Marcelo A.B. Morandi.

1128

RESUMO

Morandi, M.A.B.; Santos, E.R.; Mattos, L.P.V.; Bonugli, R.C. Associação de lodo de esgoto e *Clonostachys rosea* para a supressão de *Botrytis cinerea* em restos culturais de roseira. *Summa Phytopathologica*, v.31, p.358-366, 2005.

A produção de rosas de corte no estado de São Paulo é uma atividade de importante expressão sócio-econômica. Porém, as perdas devido ao mofo cinzento (*Botrytis cinerea* Pers.:Fr.) são significativas e levam ao uso intensivo de fungicidas, o que tem causado, entre outros problemas, a contaminação do ambiente e dos aplicadores e a predominância de isolados resistentes do patógeno. O objetivo deste trabalho foi avaliar a supressão da esporulação de *B. cinerea* em restos culturais de roseira pela associação de *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Siefert and W. Gams (ex. *Gliocladium roseum* Bainier) e matéria orgânica (MO), como alternativa para o manejo da doença. Utilizaram-se lodo de esgoto e composto orgânico a base de lodo e bagaço de cana como fontes de MO. Apesar de não ter havido aumento significativo na taxa de degradação dos restos com a aplicação de MO, verificou-se redução na esporulação de *B. cinerea* com estes tratamentos. Esta redução foi, provavelmente, devido ao aumento da competição microbiana nos restos, especialmente pela ocorrência

de *Trichoderma* sp. Nos tratamentos com *C. rosea* em condições controladas, recuperou-se o antagonista dos restos culturais por mais de 70 dias após a inoculação e verificou-se significativa redução da esporulação de *B. cinerea*. A cobertura dos restos com MO aumentou a sobrevivência de *C. rosea* e suprimiu a esporulação do patógeno em 70 a 100%, valor superior ao obtido com o antagonista ou as fontes de MO isoladamente (25 a 65%). Quando aplicado no campo, porém, o estabelecimento de *C. rosea* foi reduzido e proporcionou apenas ligeira redução na esporulação do patógeno. O desenvolvimento e produção de botões florais nas plantas adubadas com NPK, lodo e composto, ou naquelas onde foi aplicado *C. rosea*, não diferiram significativamente. Os resultados obtidos em condições controladas com o uso associado de *C. rosea* e MO na supressão de *B. cinerea* são promissores. Entretanto, é necessário identificar os fatores que afetam a performance do antagonista a campo, de forma a se estabelecer uma estratégia viável do seu uso em cultivos comerciais de roseira.

Palavras-chave adicionais: controle biológico, *Gliocladium roseum*, lodo de esgoto, composto, mofo cinzento.

ABSTRACT

Morandi, M.A.B.; Santos, E.R.; Mattos, L.P.V.; Bonugli, R.C. Association of sewage sludge and *Clonostachys rosea* to suppress *Botrytis cinerea* on rose debris. *Summa Phytopathologica*, v.31, p.358-366, 2005.

The cultivation of cut roses is an important social-economic activity in the State of São Paulo. However, there are significant losses due to the occurrence of gray mold caused by *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. in the crop. The intensive use of fungicides for the control of this disease has, as consequences, contamination of the environment and workers, and the predominance of resistant isolates of *B. cinerea*. The main objective of this study was to evaluate the effects of the associated use of *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Siefert and W. Gams (ex. *Gliocladium roseum* Bainier) and organic matter (OM) as an alternative method to suppress *B. cinerea* sporulation on rose debris. Crude and composted (with sugar cane bagasse) sewage sludge were used as OM sources. Although the application of the OM did not accelerate the degradation rate of the rose debris, it significantly suppressed the *B. cinerea* sporulation by increasing the microbial

competition, especially due to the occurrence of *Trichoderma* sp. When applied alone, *C. rosea* was recovered from the debris for more than 70 days after inoculation in controlled conditions. It also significantly reduced the pathogen sporulation. When associated with the OM sources, *C. rosea* consistently suppressed *B. cinerea* sporulation by 70 to 100%, which was higher than the values found for the suppression of the fungus by OM or *C. rosea* alone (25 to 65%). In commercial field conditions, however, the survival of *C. rosea* was severely reduced, and only a slight reduction on *B. cinerea* sporulation was observed. The development of the plants and the flowers yield were not affected by the use of *C. rosea* or the OM sources. These results indicate that the associated use of *C. rosea* and OM for *B. cinerea* suppression on rose debris is promising, but it is still necessary to identify the factors that affect the antagonist's performance in the field in order to implement its commercial use.

As exportações de flores e plantas ornamentais atingiram US\$ 2,49 milhões em junho de 2004, o maior valor mensal já comercializado pelo País, no segmento da floricultura. As projeções de fechamento do ano de 2004 são de US\$ 25 milhões, o que representa um aumento de cerca de 30% em relação ao ano de 2003 (13). Neste mercado, as flores frescas de corte ocupam a segunda posição, só perdendo para o segmento de mudas de plantas ornamentais. A maior parcela das flores frescas exportadas pelo Brasil constituem-se em rosas, crisântemos, lisianthus e gérbas, entre outras e são originárias, principalmente, do estado de São Paulo, que responde por quase 80% das vendas externas. No caso específico de rosas, a produção no Brasil gira em torno de 16 a 20 milhões de dúzias por ano. A expansão do mercado externo, especialmente nos países Europeus, traz novas perspectivas para a floricultura brasileira, no entanto, o setor produtivo precisa se aprimorar para atender aos padrões de qualidade requeridos (23).

Um dos principais problemas fitossanitários da roseira é o mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. A doença provoca perdas severas tanto no campo quanto durante o armazenamento e transporte, mesmo sob baixa temperatura (2 a 5 °C) (12, 28). O patógeno é de difícil controle por apresentar diferentes estratégias de sobrevivência e infecção, além de grande variabilidade genética. O uso intensivo de fungicidas tem causado problemas que incluem aumento do custo de produção, crescimento da poluição ambiental, predominância de isolados do patógeno resistentes a fungicidas, contaminação dos aplicadores e efeitos danosos à microbiota saprofítica, que exerce papel vital no equilíbrio biológico (7).

Entre as várias formas de controle propostas para o mofo cinzento, que não envolvem o uso de fungicidas, destacam-se: o manejo de restos de cultura e o controle biológico (7, 8, 9, 15, 20, 26). Como a principal fonte de inóculo de *B. cinerea* em cultivos de roseiras são os restos culturais, compostos por pétalas, hastes e, principalmente, folhas, diversos autores (1, 5, 24) recomendam a eliminação destes restos como medida importante para o manejo da doença. Entretanto, essa prática é de difícil execução e requer considerável gasto de mão-de-obra. Assim, o manejo dos restos culturais com o uso de práticas que estimulem o desenvolvimento de antagonistas com capacidade de suprimir a esporulação do patógeno é uma alternativa viável.

Para suprimir a esporulação de patógenos necrotróficos, como *B. cinerea*, o antagonista deve ser capaz de colonizar rapidamente o substrato, mesmo na presença do patógeno e de competir eficientemente com ele (15). Tentativas de controle biológico de *B. cinerea* nas quais se tem buscado proteger folhas verdes e flores da infecção pelo patógeno têm tido pouco sucesso, devido ao curto tempo de interação entre patógeno e antagonista no filoplano (7, 9). Entretanto, a estratégia que se baseia na supressão do crescimento micelial saprofítico de *B. cinerea* nos restos culturais pode reduzir a esporulação do patógeno e retardar o início da epidemia. Uma vantagem adicional desta estratégia é o longo tempo de interação entre o patógeno e os antagonistas (15, 25).

O fungo *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Siefert and W. Gams (ex. *Gliocladium roseum* Bainier) é capaz de se estabelecer e suprimir a esporulação de *B. cinerea* em

tecidos de roseira sob diferentes condições (19, 20, 21, 22, 27). A eficiência de *C. rosea* está diretamente relacionada à habilidade do antagonista em colonizar os tecidos senescentes mais rapidamente que o patógeno (20, 21). Neste sentido, fatores como o estágio de desenvolvimento de folhas e pétalas quando da aplicação dos esporos do antagonista, a comunidade microbiana associada a estes tecidos, as condições climáticas predominantes durante os eventos da colonização e a presença de resíduos de fungicidas determinam a eficiência de *C. rosea* (19, 20, 26, 29). A habilidade de *C. rosea* em crescer endofiticamente em tecidos verdes, sem causar danos ao hospedeiro, confere ao antagonista importante vantagem competitiva em relação ao patógeno na colonização dos tecidos durante sua senescência (14, 20, 26, 29). Desta forma, a aplicação do antagonista na parte aérea da planta pode contribuir para suprimir a esporulação do patógeno nos restos culturais.

O estímulo ao desenvolvimento de comunidades naturais de microrganismos nos restos culturais é outra possível estratégia de supressão da esporulação de *B. cinerea*. Isto pode ser implementado pela adição de matéria orgânica rica em nitrogênio, como por exemplo, o lodo de esgoto gerado nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETE). Apenas na grande São Paulo é gerado 500 Mg.dia⁻¹ de lodo de esgoto base seca. Assim, é necessário desenvolver alternativas seguras e factíveis para esse produto não se transformar num novo problema ambiental, mas sim tirar vantagens ambientais de sua disposição (4). Entre as alternativas, a disposição agrícola tem sido avaliada, pois os lodos são ricos em macro e micro nutrientes, com reconhecida capacidade de aumentar a produtividade de culturas em diferentes solos (16). O efeito nutricional do lodo de esgoto nas plantas está bem documentado na literatura. No entanto, em relação aos seus efeitos sobre as doenças de plantas, existem poucas informações disponíveis. O lodo de esgoto pode colaborar no controle de doenças de plantas, principalmente as causadas por patógenos veiculados pelo solo e por aqueles que sobrevivem nos restos culturais devido à sua capacidade em ativar e modificar a microbiota do solo e dos resíduos vegetais. Bettiol & Santos (3) citam vários patossistemas onde a incorporação de lodo de esgoto nos solos reduziu a incidência ou a severidade de doenças. Por outro lado, existem também relatos de aumento de doenças com a incorporação do lodo de esgoto, como as podridões radiculares causadas por *Pythium ultimum* e *Thielaviopsis basicola* em feijão, ervilha e algodão (17) e de colmo do milho, causada por *Fusarium* spp. (2).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do uso integrado de lodo de esgoto e do agente de controle biológico *C. rosea* na supressão da esporulação de *B. cinerea* em restos culturais de roseiras.

MATERIALE MÉTODOS

Plantas de rosa

Para os ensaios de laboratório e casa de vegetação utilizaram-se plantas de rosa cultivar 'Nívea'. As plantas foram mantidas em casa de vegetação em vasos de 18 L contendo uma mistura (1:1 v/v) de terra de subsolo e substrato (Composto Orgânico Básico ProVaso ou Multiplant Terra do Paraíso).

Foram realizadas adubações de manutenção a cada 15 a 20 dias com adubo líquido completo Ouro Verde. O ensaio em campo foi realizado em plantio comercial com a mesma cultivar, com aproximadamente dois anos de idade, em Holambra, SP.

Lodo de esgoto e composto

O lodo de esgoto e composto orgânico a base de lodo de esgoto e bagaço de cana utilizados nos ensaios foram obtidos na Estação de Tratamento de Esgotos de Jundiá, SP. A análise físico-química dos materiais está apresentada na Tabela 1.

As doses utilizadas de lodo de esgoto e composto foram definidas de forma que o volume final aplicado fosse semelhante e proporcionasse uma cobertura homogênea dos restos culturais entre os tratamentos. Como a relação das densidades do lodo (900 Kg/m³) e do composto (476 Kg/m³) é próxima de 2, estabeleceu-se a dose de composto como a metade da dose de lodo.

Inóculo de *Botrytis cinerea* e de *Clonostachys rosea*

Nos ensaios de laboratório utilizou-se um isolado de *B. cinerea* obtido de botões de rosa e um isolado de *C. rosea* obtido de restos culturais de roseira, ambos mantidos em cultura pura em BDA. Para o ensaio a campo, inóculo do antagonista foi produzido em grãos de arroz, conforme protocolo descrito por Morandi (18). Na área ocorrem epidemias naturais de *B. cinerea* durante todo o ano, não sendo necessária inoculação com o patógeno.

Tabela 1. Análise físico-química do lodo de esgoto e do composto orgânico utilizado nos experimentos.

Atributo	Unidade	Lodo	Composto
Fósforo	g.kg ⁻¹	6,6	3,8
Potássio	g.kg ⁻¹	1,1	1,6
Sódio	g.kg ⁻¹	1,8	1,9
Arsênio	mg.kg ⁻¹	<0,1	<0,1
Cádmio	mg.kg ⁻¹	7,5	9,3
Chumbo	mg.kg ⁻¹	192,0	97,05
Cobre	mg.kg ⁻¹	856,2	384,9
Cromo total	mg.kg ⁻¹	180,6	79,8
Mercúrio	mg.kg ⁻¹	<0,1	<0,1
Molibdênio	mg.kg ⁻¹	<0,1	<0,1
Níquel	mg.kg ⁻¹	33,1	26,5
Selênio	mg.kg ⁻¹	<0,1	<0,1
Zinco	mg.kg ⁻¹	1588,8	621,0
Boro	mg.kg ⁻¹	15,0	7,6
pH		5,6	6,0
Carbono orgânico	g.kg ⁻¹	303,6	294,35
Nitrogênio Kjeldhal	g.kg ⁻¹	28,0	18,0
Nitrogênio-amoniaco	mg.kg ⁻¹	50,8	2342,0
Nitrogênio Nitrato-Nítrico	mg.kg ⁻¹	112,2	30,3
Enxofre	g.kg ⁻¹	25,8	12,9
Manganês	mg.kg ⁻¹	688,3	389,2
Ferro	g.kg ⁻¹	13,3	94,49
Magnésio	g.kg ⁻¹	2,1	1,33
Alumínio	mg.kg ⁻¹	17620	18410
Cálcio	g.kg ⁻¹	10,5	6,58
Sólidos voláteis	%	62,8	46,5
Umidade	%	75,8	24,6

Incidência de fungos saprófitas, estabelecimento de *Clonostachys rosea* e supressão da esporulação de *Botrytis cinerea* nos restos culturais em condições controladas

Para avaliar as alterações na incidência de fungos saprófitas nos restos culturais cobertos por lodo de esgoto ou composto foi utilizado o método de incubação de tecidos em meio PCA (Paraquat Cloranfenicol Ágar), descrito por Sutton & Peng (25) e modificado por Morandi (18). Para tal, folhas de roseiras cultivadas na casa de vegetação foram colhidas e acondicionadas em bandejas plásticas previamente forradas com papel toalha esterilizado e umedecido com água destilada esterilizada. As folhas foram cobertas por lodo de esgoto (dose para fornecer 900 Kg.ha⁻¹ de N), composto (dose para fornecer 450 Kg.ha⁻¹ de N) ou mantidas sem cobertura (testemunha). As quantidades de lodo e composto para cobrir as folhas foram calculadas considerando-se a dose desejada e a área da superfície interna das bandejas. O material foi mantido por 48 h em câmara de crescimento a 25±2 °C, fotoperíodo de 12 h e umidade relativa do ar (UR) de 50 a 60 %. Após este período, discos de folhas (1 cm de diâmetro) foram retirados e plaqueados em PCA e mantidos por 7 a 10 dias nas mesmas condições descritas. Após este período, avaliou-se a frequência de ocorrência de colônias fúngicas nos discos. Os microrganismos presentes nos discos foram isolados, mantidos em cultura pura em BDA e identificados ao nível de gênero por análise morfológica. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso, com três tratamentos e três repetições. De cada repetição foram preparadas quatro placas com 12 discos de folhas cada, totalizando 144 discos avaliados por tratamento. O ensaio foi repetido.

Para avaliar o estabelecimento e sobrevivência de *Clonostachys rosea* em restos cobertos com lodo de esgoto ou composto, folhas de roseira foram coletadas e acondicionadas em bandejas plásticas como descrito anteriormente. As folhas foram pulverizadas com suspensão de 10⁷ conídios.mL⁻¹ de *C. rosea* e mantidas por 24 h em câmara de crescimento a 25±2 °C, fotoperíodo de 12 h e UR acima de 90%. Após este período, as folhas tratadas com o antagonista foram cobertas por lodo de esgoto e composto nas doses de 900 e 450 Kg.ha⁻¹ de N, respectivamente, ou mantidas sem cobertura em condições de alta umidade (>90%) ou UR ambiente (50-60%). Amostras de folhas foram retiradas em intervalos semanais e plaqueadas em PCA para recuperação de *C. rosea*. No primeiro ensaio, amostras foram retiradas até 70 dias após a inoculação (DAI) e no segundo, até 78 DAI. Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso, com quatro tratamentos e três repetições. De cada repetição, em cada coleta, foram preparadas três placas com 12 discos (limbo foliar) ou 12 segmentos de 1 cm (haste) cada, totalizando 108 discos ou segmentos avaliados por tratamento, por coleta. No segundo ensaio avaliou-se apenas o limbo foliar.

Para avaliar o efeito da aplicação de *C. rosea* e lodo de esgoto ou composto, isolados ou em combinação, sobre a esporulação de *B. cinerea* nos restos culturais, folhas de roseira foram coletadas, acondicionadas em bandejas plásticas, pulverizadas com suspensão de 10⁴ conídios.mL⁻¹ de *B. cinerea* e mantidas por 24 h em câmara de crescimento a 25±2 °C, fotoperíodo de 12 h e UR acima de 90%. Após este período, as folhas foram cobertas com lodo de esgoto e composto nas doses descritas, ou pulverizadas com *C. rosea* (10⁷ conídios.mL⁻¹) e cobertas com lodo ou composto. Amostras de folhas foram retiradas após 7, 14 e 28 dias da inoculação do patógeno e

plaqueadas em PCA para se avaliar a esporulação do patógeno e do antagonista. Para avaliação do patógeno foi utilizada a escala de notas desenvolvida por Sutton & Peng (25) e, para *C. rosea*, a escala descrita por Morandi et al. (21). O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso, com seis tratamentos e três repetições. De cada repetição, em cada coleta, foram preparadas três placas com 12 discos cada, totalizando 108 discos avaliados por tratamento, por coleta. O ensaio foi repetido.

Aplicação de *Clonostachys rosea*, lodo e composto em roseiras em casa de vegetação

Para avaliar o desenvolvimento e produção de botões florais em roseiras em função do uso de lodo e composto, foi conduzido um ensaio em casa de vegetação. Os seguintes tratamentos foram realizados: adubação com NPK (padrão utilizado pelo produtor, em torno de 1000 Kg.ha⁻¹ de N); adubação com lodo de esgoto para fornecer 600 kg.ha⁻¹ de N e adubação com composto para fornecer 300 kg.ha⁻¹ de N. Foi incluída uma testemunha NPK onde foi aplicado também *C. rosea*. O ensaio foi conduzido em delineamento em blocos ao acaso, com cinco repetições. Os tratamentos foram aplicados inicialmente após a realização de poda no mês de julho/2003 e repetidos a cada três meses. Em intervalos quinzenais, a partir de agosto/2003 até agosto/2004, avaliou-se o número de botões florais em ponto de colheita. Após cada avaliação os botões foram removidos. Em intervalos mensais a partir de julho/2003 até fevereiro/2004 (com exceção dos meses de outubro e novembro) avaliou-se o conteúdo de clorofila das folhas do terço médio das plantas. Essa medida foi usada como indicativo de balanço nutricional nas plantas. Para tanto, utilizou-se um medidor de conteúdo de clorofila Minolta SPAD. A medida é adimensional e possui valor comparativo entre os tratamentos. Em cada planta, em cada data, foram avaliadas 25 folhas.

Em outro ensaio, avaliou-se o efeito da aplicação prolongada de *C. rosea* sobre as plantas de roseira. Para tal, plantas foram pulverizadas com suspensão do antagonista (10⁷ conídios.mL⁻¹) ou com água (testemunha) em intervalos semanais de julho/2003 até fevereiro/2004. Em intervalos mensais avaliaram-se: o conteúdo de clorofila das folhas do terço médio das plantas e o número de botões florais por planta. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso, com três repetições.

Para avaliar a degradação dos restos culturais em função da aplicação de lodo ou composto, folhas de roseira foram coletadas, acondicionadas em envelopes de tela plástica (tela mosquiteiro), colocadas na superfície do solo sob cultivo de rosas em casa de vegetação e cobertas por lodo, composto, solo de cultivo ou mantidas sem cobertura (testemunha). A cada sete dias os envelopes foram retirados, limpos, secos ao ar e pesados, até não haver mais alteração no peso da testemunha. O ensaio foi conduzido em delineamento em blocos ao acaso, com cinco repetições.

Aplicação de *Clonostachys rosea*, lodo e composto em cultivo comercial a campo

O ensaio foi conduzido em uma área de produção comercial a campo de rosas, no município de Holambra, SP, onde ocorrem epidemias de *B. cinerea*. Os tratos culturais não relacionados ao experimento (irrigação, colheita, aplicação de agrotóxicos e outros) foram feitos conforme as práticas adotadas pelo produtor. Os seguintes tratamentos foram realizados: 1. Adubação

padrão adotada pelo produtor (em torno de 1000 Kg.ha⁻¹ de N); 2. Lodo de esgoto para fornecer 600 Kg.ha⁻¹ de N + complementação com P e K; 3. Lodo de esgoto para fornecer 900 Kg.ha⁻¹ de N + complementação com K; 4. Composto para fornecer 300 Kg.ha⁻¹ de N; e 5. Composto para fornecer 450 Kg.ha⁻¹ de N. A aplicação do lodo de esgoto e composto foi realizada logo após a poda no mês de agosto de 2002. O material foi distribuído na superfície do solo, cobrindo os restos culturais ali presentes. No tratamento 1, os fertilizantes foram parcelados a cada 15 dias a partir da poda, conforme prática tradicional dos produtores.

Aplicou-se *C. rosea* quinzenalmente em todos os tratamentos. A aplicação do antagonista foi realizada, via pulverização, ressuspensando-se o inóculo do fungo em água mais surfactante (Tween 80, 0,5 mL.L⁻¹ de água), obtendo-se concentração final de 10⁷ conídios.mL⁻¹. Nas pulverizações, utilizou-se pulverizador costal e aplicou-se 1 L de calda para cada 10 m² de canteiro, atingindo os terços médio e inferior das plantas. Foi incluída uma testemunha adubada com NPK e sem a aplicação de *C. rosea*.

O ensaio foi conduzido em delineamento em blocos ao acaso com três repetições. As dimensões de cada parcela foi de 5 x 5 m, incluindo 5 linhas de cultivo. As avaliações foram realizadas nas três linhas centrais de cada parcela.

Amostras de restos culturais foram coletadas de setembro/2002 a julho/2003, em intervalos de 15 a 20 dias para avaliação da esporulação do patógeno e sobrevivência de *C. rosea*. As amostras eram compostas de 30 a 40 folhas recém caídas das plantas. De cada amostra retiraram-se 24 discos que foram plaqueados em PCA e incubados por 7 a 10 dias. Após este período, foram calculadas a incidência de *B. cinerea* e *C. rosea* nos restos.

Amostras de solo foram retiradas nas parcelas mensalmente de dezembro/2002 a julho/2003 para análise de atividade microbiana total, por meio da hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) (11).

O desenvolvimento das plantas foi avaliado visualmente ao longo do ensaio e a produtividade foi avaliada pela contagem do número de botões com padrão comercial em áreas previamente demarcadas de 1 m² nas três linhas centrais de cada parcela. Foram realizadas duas avaliações em períodos de pico de produção.

Análise dos resultados

Para a análise dos resultados, foi utilizado o pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). Dados de esporulação e crescimento fúngico foram analisados por análise de variância (ANOVA) e os tratamentos comparados pelo teste de Tuckey ou LSD. A Área Abaixo da Curva de Esporulação (AACE) de *C. rosea* e de *B. cinerea* foi calculada para os ensaios de sobrevivência de *C. rosea* e para o ensaio de campo. Os dados de degradação de restos culturais foram ajustados ao modelo exponencial negativo, representado pela equação $y = a \cdot \exp(-b \cdot x)$; onde: y é o peso da amostra em gramas; a representa o peso inicial da amostra; b a taxa de degradação; e, x o tempo. As curvas foram comparadas por meio do intervalo de confiança das diferenças (IC_d) entre as taxas de degradação (b) (6). Por esta análise, quando o IC_d inclui o valor zero, aceita-se a hipótese nula, ou seja, que os parâmetros não diferem.

RESULTADOS

Incidência de fungos saprófitas, estabelecimento de *Clonostachys*

rosea e supressão da esporulação de *Botrytis cinerea* nos restos culturais em condições controladas

Em ambos os ensaios, o lodo de esgoto e o composto alteraram a ocorrência e frequência de fungos nos restos culturais. Assim os dados foram agrupados para análise (Figura 1). Qualitativamente, as mudanças mais significativas foram a ocorrência de *Trichoderma* sp. e *Verticillium* sp. e a supressão de *Alternaria* sp. e *Gonatotryps* sp.

Clonostachys rosea foi recuperado até 70 DAI em restos culturais cobertos com lodo, composto ou mantidos sem cobertura, exceto naquele em que as folhas foram mantidas em alta UR (>90%) por todo o período. Neste último caso, a decomposição foliar foi acelerada e observou-se o intenso crescimento de bactérias, só sendo possível recuperar o fungo até 35 DAI em limbo foliar e 42 DAI em hastas. A recuperação de *C. rosea* nos tratamentos com lodo e composto foi significativamente superior à testemunha para ambos os tecidos (Figura 2A). Não se observou diferença na velocidade de degradação das folhas mantidas com ou sem cobertura com lodo e composto, porém em baixa umidade relativa (50-60%). No segundo ensaio, verificou-se a mesma tendência, entretanto *C. rosea* foi recuperado até 78 DAI (Figura 2B).

A aplicação de lodo de esgoto e composto proporcionou redução na esporulação de *B. cinerea* aos 7 e 28 DAI e aos 14 e 28 DAI no primeiro e segundo ensaios, respectivamente (Figuras 3A e 3B). O tratamento com *C. rosea* suprimiu a esporulação do patógeno nas três avaliações no primeiro ensaio, porém a redução foi menor a cada avaliação. No segundo ensaio, *C. rosea* suprimiu o patógeno apenas após 28 DAI. As combina-

ções de lodo ou composto mais *C. rosea* suprimiram consistentemente (>70%) a esporulação de *B. cinerea* em todas as avaliações em ambos os ensaios (Figuras 3A e 3B). De forma semelhante ao obtido no ensaio anterior, o crescimento de *C. rosea* aumentou na presença de lodo e composto.

Aplicação de *Clonostachys rosea*, lodo e composto em roseiras em casa de vegetação

Plantas adubadas com NPK, lodo ou composto não diferiram significativamente no desenvolvimento e produção de botões florais. A produtividade média variou de 22 a 27 botões por planta no período avaliado. O teor de clorofila nas plantas adubadas com NPK ou lodo/composto variou com a época do ano. Observou-se redução significativa no teor de clorofila nas plantas adubadas com composto nos meses de setembro e outubro (Figura 4). A aplicação semanal de *C. rosea* em plantas na casa de vegetação não afetou o crescimento, o conteúdo de clorofila e a produção de botões florais.

Os dados de degradação de restos cobertos com lodo, composto, solo de cultivo ou mantidas sem cobertura se ajustaram adequadamente ao modelo exponencial negativo (Figura 5). As taxas foram comparadas duas a duas pelo intervalo de confiança da diferença (IC_d) entre os parâmetros (teste t, $P=0,05$). Não houve diferenças significativas entre nenhum dos tratamentos, uma vez que, em todas as comparações, o IC_d incluiu o valor zero. Na testemunha, a perda de peso foi inicialmente acelerada em função da rápida desidratação do material.

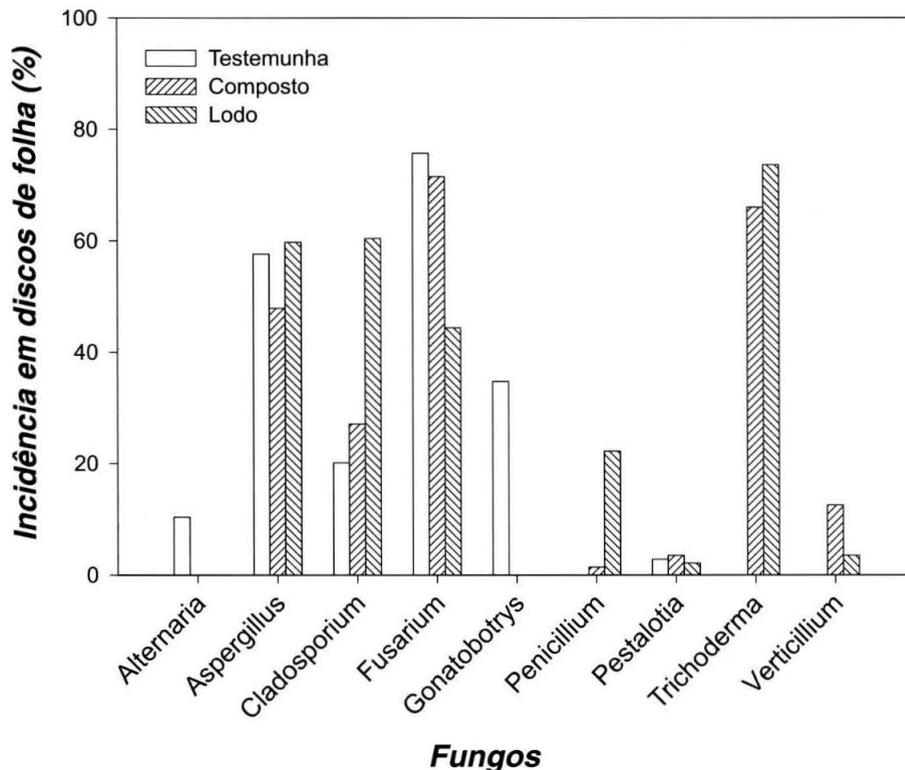


Figura 1. Incidência de fungos em folhas de roseira cobertas com lodo de esgoto e composto orgânico, ou mantidas sem cobertura (testemunha). As barras representam a porcentagem de recuperação dos fungos em um total de 144 discos de folhas por tratamento. Média dos dois ensaios.

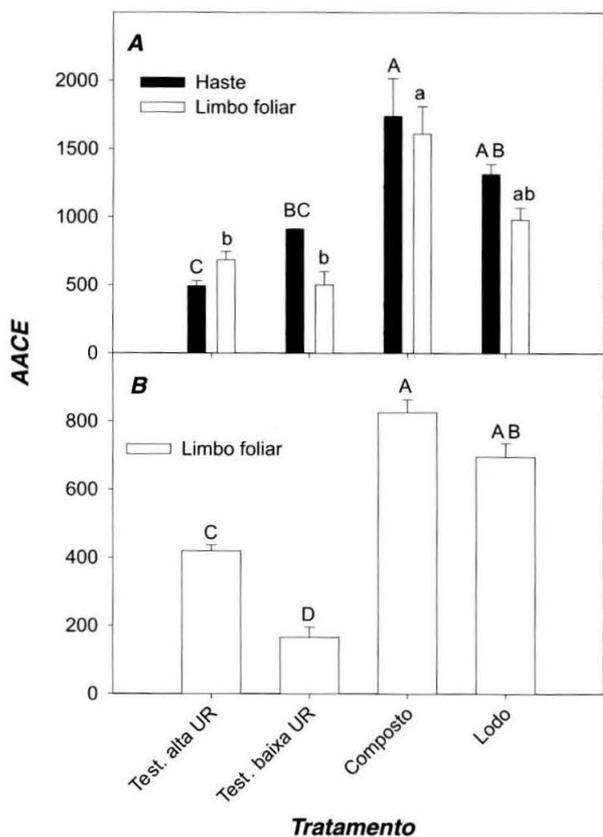


Figura 2. Área abaixo da curva de esporulação (AACE) de *Clonostachys rosea* em discos de limbo foliar e hastes foliares de roseira inoculadas com o fungo e mantidas sob os seguintes tratamentos: 1- testemunha alta UR (UR>90%); 2- Testemunha baixa UR (UR ambiente = 50 a 60 %); 3- cobertas com composto; e, 4- cobertas com lodo de esgoto. As amostras foram retiradas em intervalos semanais até 70 dias após a inoculação (DAI) no ensaio 1 (A) e 78 DAI no ensaio 2 (B). As barras são valores médios, cada uma com erro padrão. Médias de tratamentos para dado tecido (haste ou limbo) seguidas pela mesma letra não diferem significativamente (Fisher pLSD, $P \leq 0,05$).

Aplicação de *Clonostachys rosea*, lodo e composto em cultivo comercial a campo

Obtiveram-se os valores de incidência de discos de restos de cultura com esporulação de *B. cinerea* e, ou, *C. rosea* e calculou-se a AACE para cada fungo (Figura 6). Verificou-se ligeira redução na AACE de *B. cinerea* em função da aplicação de *C. rosea*, porém não houve diferença entre os tratamentos com lodo, composto ou NPK. A recuperação de *C. rosea* a partir das amostras de restos coletadas foi relativamente baixa e apresentou grande variabilidade. Nas parcelas da testemunha verificou-se a presença esporádica e em baixo nível de *C. rosea*. Como antes do início dos experimentos o fungo não foi detectado na área experimental, este efeito foi atribuído à contaminação destas parcelas por conídios oriundos das parcelas tratadas com *C. rosea*.

A atividade microbiana total do solo, medida pela hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) variou com a época da coleta da amostra, com pico de atividade no mês de janeiro. Entretanto, só ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos nos meses de dezembro, março e maio. Nos meses de dezembro e maio, ocorreu redução da atividade microbiana total no tratamento com

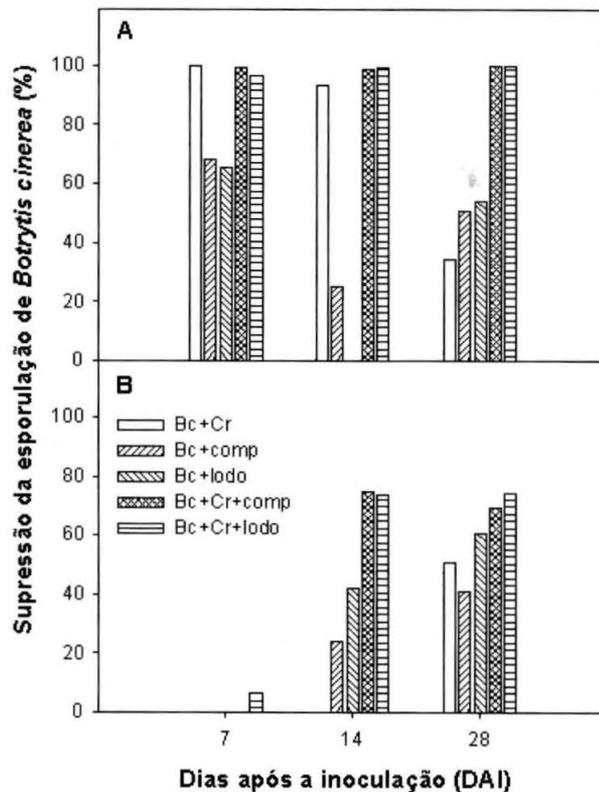


Figura 3. Supressão da esporulação de *Botrytis cinerea* (Bc) em folhas inoculadas com o patógeno, na presença ou ausência de *Clonostachys rosea* (Cr) e mantidas em condição ambiente (Bc; Bc+Cr), cobertas com composto (Bc+Comp; Bc+Cr+Comp) ou com lodo de esgoto (Bc+Lodo; Bc+Cr+Lodo). As amostras foram retiradas aos 7, 14 e 28 dias após a inoculação, e avaliadas quanto a esporulação de *B. cinerea* pela técnica de incubação de tecidos em PCA. (A) ensaio 1; (B) ensaio 2.

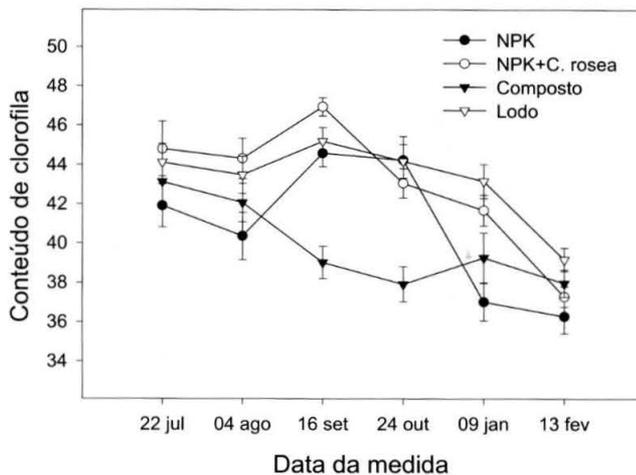


Figura 4. Conteúdo de clorofila (medidor de clorofila Minolta SPAD) nas folhas do terço médio de plantas de roseira adubadas com NPK, NPK + aplicação de *C. rosea*, lodo de esgoto ou composto orgânico a base de lodo de esgoto e bagaço de cana. A medida é adimensional e possui valor comparativo entre os tratamentos. As curvas mostram valores médios com barras de erro padrão.

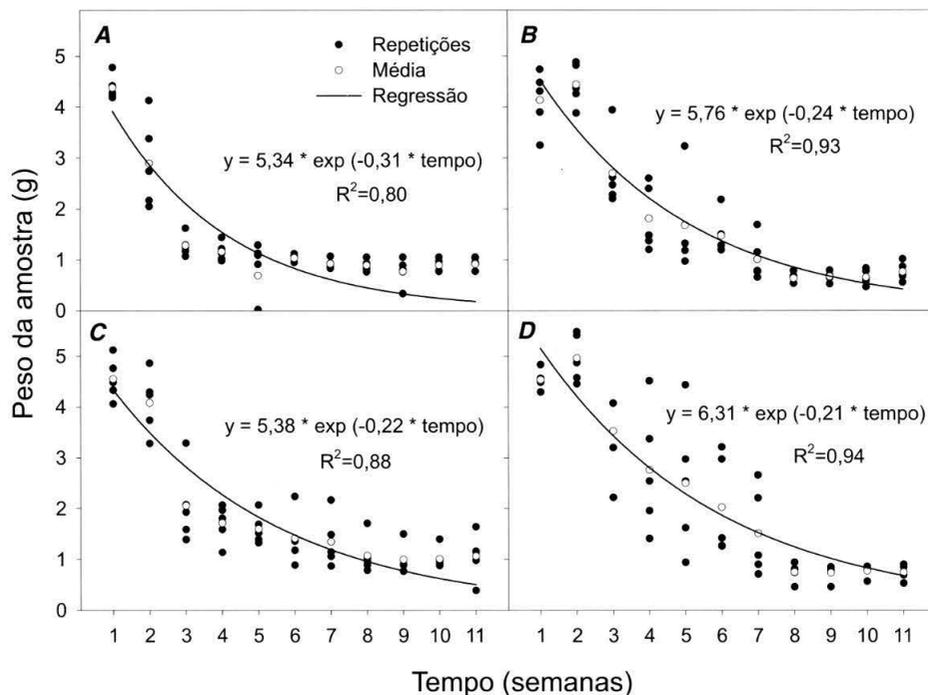


Figura 5. Degradação de restos culturais de roseira (A) mantidos sem cobertura na superfície do solo (testemunha); (B) cobertos com solo de cultivo; (C) cobertos com lodo de esgoto; ou, (D) cobertos com composto orgânico a base de lodo e bagaço de cana. Os dados foram ajustados por regressão ao modelo exponencial negativo ($y = a * \exp(-b * x)$; onde: y é o peso da amostra em gramas; a representa o peso inicial da amostra; b a taxa de degradação; x , o tempo). Média de cinco repetições. As curvas foram comparadas por meio do intervalo de confiança das diferenças entre os parâmetros, segundo proposto por Campbell e Madden (6) e não apresentam diferenças significativas (teste t , $P=0,05$).

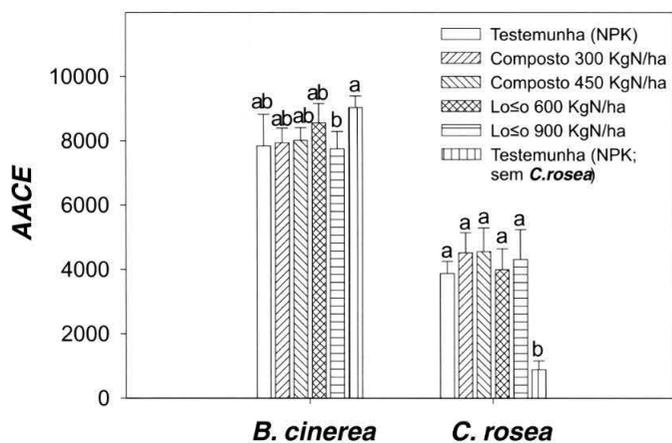


Figura 6. Área abaixo da curva de esporulação (AACE) de *Botrytis cinerea* e *Clonostachys rosea* em discos de folhas retirados em intervalos de 15 a 20 dias de restos culturais de roseiras adubadas com adubo mineral (Testemunha NPK), lodo de esgoto (Lodo 600 Kg.ha⁻¹ de N; Lodo 900 Kg.ha⁻¹ de N) ou composto orgânico a base de lodo de esgoto e bagaço de cana (Composto 300 Kg.ha⁻¹ de N; Composto 450 Kg.ha⁻¹ de N), onde foi aplicado *C. rosea* a cada 15-20 dias ou água apenas (Testemunha NPK sem *C. rosea*). Foram realizadas 18 coletas entre setembro/2002 e julho/2003. As barras são valores médios cada uma com erro padrão. Médias de tratamentos para dado fungo seguidas pela mesma letra não diferem significativamente (Fisher pLSD, $P \leq 0,05$).

dose alta de lodo (900 Kg.ha⁻¹ de N). Apenas no mês de março a atividade microbiana foi significativamente menor na testemunha

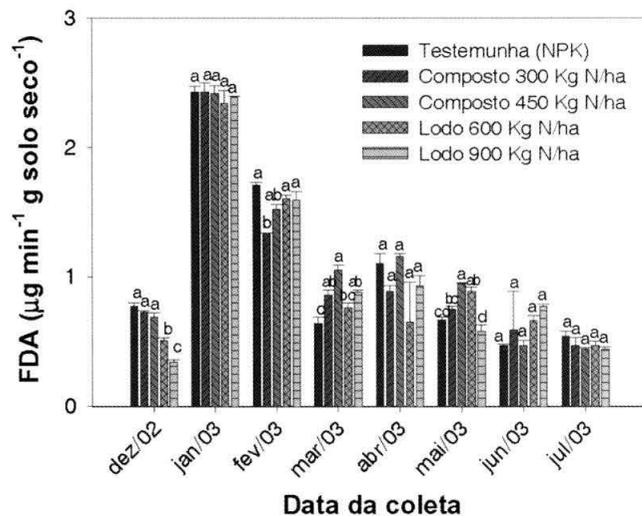


Figura 7. Atividade microbiana total medida pela hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) em canteiros de roseiras adubadas com adubo mineral (Testemunha NPK), lodo de esgoto (Lodo 600 Kg.ha⁻¹ de N; Lodo 900 Kg.ha⁻¹ de N) ou composto orgânico a base de lodo de esgoto e bagaço de cana (Composto 300 Kg.ha⁻¹ de N; Composto 450 Kg.ha⁻¹ de N). Foram realizadas amostragens mensais entre dezembro/2002 e Julho/2003. As barras são valores médios cada uma com erro padrão. Médias de tratamentos em dada época de avaliação seguidas pela mesma letra não diferem significativamente (Fisher pLSD, $P \leq 0,05$).

em relação aos demais tratamentos (Figura 7).

A produção de botões.m⁻² de canteiro foi de (média±erro)

20,1±1,83 na testemunha; 17,8±1,52 e 19,2±1,87 nos tratamentos com composto nas doses 300 e 450 Kg.ha⁻¹, respectivamente; e 22,0±2,04 e 23,8±1,78 nos tratamentos com lodo nas doses 600 e 900 Kg.ha⁻¹ de N, respectivamente. As médias não diferiram significativamente pelo teste de Tuckey a 5%.

DISCUSSÃO

Clonostachys rosea estabeleceu-se eficientemente nos restos culturais de roseira em condições controladas, o que pode ser evidenciado pela recuperação do fungo até mais de 70 dias após a inoculação e pela significativa redução da esporulação de *B. cinerea* nos tratamentos com o antagonista. A cobertura dos restos com lodo de esgoto ou composto melhorou a sobrevivência de *C. rosea* e proporcionou controle da esporulação do patógeno superior ao obtido com o antagonista ou as fontes de matéria orgânica isoladamente. O aumento da sobrevivência de *C. rosea* nas folhas tratadas com o fungo e cobertas com a matéria orgânica pode estar relacionado a menor taxa de dessecação observada no material vegetal, quando comparada às folhas mantidas sem cobertura. Quando as folhas foram mantidas sob alta umidade, houve aceleração da sua decomposição que levou ao esgotamento rápido de nutrientes e consequente redução da sobrevivência de *C. rosea*.

A cobertura dos restos com as fontes de matéria orgânica não acelerou a degradação dos tecidos. Portanto, a redução na esporulação de *B. cinerea* obtida nos tratamentos com o lodo e o composto foi, provavelmente, devida às alterações qualitativas e ao incremento na comunidade microbiana na superfície dos tecidos, especialmente pela introdução de fungos com reconhecida capacidade antagonista a patógenos necrotróficos, como *Trichoderma* sp.

A aplicação semanal de *C. rosea* por longo período não provocou alterações visíveis nas plantas, não afetou a fotossíntese (evidência indireta pela avaliação do conteúdo de clorofila) e a produção de botões florais. Esses dados reforçam que o uso do fungo é seguro para as plantas (26, 30).

Quando aplicado no campo, o estabelecimento de *C. rosea* nos restos culturais foi reduzido e proporcionou apenas ligeira redução da esporulação do patógeno. Estes dados contrastam com os obtidos anteriormente em cultivos comerciais de roseiras em casa de vegetação (19). Segundo estes autores, *C. rosea* estabeleceu-se e controlou eficientemente a esporulação de *B. cinerea* nos restos culturais. Entre as causas possíveis desta discrepância, destacam-se: a maior flutuação climática no campo, a incidência direta de radiação UV e a aplicação de fungicidas para o controle de outras doenças (míldio e pinta-preta) durante o experimento. Uma vez que, de forma semelhante ao trabalho em casa de vegetação, a aplicação de *C. rosea* no campo foi realizada sempre no final da tarde (após as 17:00h), quando a incidência de radiação solar é menor e as condições de evaporação são reduzidas, supõe-se que esta não tenha sido a causa prioritária do baixo estabelecimento do antagonista no campo. Outro fator que pode ser considerado é a competição com as populações microbianas autóctones do solo e dos restos culturais. Há relatos da inibição de *C. rosea* por altas populações de fungos saprófitas (21). Entretanto, como no presente trabalho verificou-se aumento do crescimento de *C. rosea* nos restos culturais tratados com lodo e composto, esta também não deve ter sido a principal causa do baixo estabelecimento do

fungo no campo. Durante o período de condução do experimento, realizou-se, em média, uma aplicação de fungicidas a cada 10 dias (dados do produtor). Em contraste, no relato anterior em casa de vegetação só foram usados fungicidas para controle de míldio e em intervalos maiores. Como *C. rosea* é bastante sensível aos principais fungicidas utilizados na cultura da roseira (18), este fato sugere que o uso intensivo de fungicidas afetou o estabelecimento de *C. rosea* no campo.

A incorporação de lodo de esgoto no solo, em geral, provoca aumento na atividade microbiana total (10). Entretanto, neste ensaio, a aplicação superficial de lodo de esgoto e composto não proporcionou alteração significativa na atividade microbiana total no solo, no período avaliado. Como as fontes de matéria orgânica utilizadas no experimento são ricas em macro e micronutrientes essenciais ao crescimento das plantas (4, 16) e foram usadas em concentrações elevadas, tomando-se como base a adubação nitrogenada usual na cultura, não foram observadas alterações significativas no estado nutricional das plantas e na produtividade média de flores. No ensaio em casa de vegetação, observou-se redução significativa no teor de clorofila nas plantas adubadas com composto nos meses de setembro e outubro, o que pode ser explicado pela maior relação C:N no composto e maior demanda de N pela planta neste período do ano. Este resultado indica a necessidade de complementação nutricional com N no caso do uso de composto em substituição ao adubo mineral.

Considerando que os restos culturais de roseira constituem a principal fonte de inóculo de *B. cinerea* (1) e que o progresso da epidemia do mofo cinzento no sistema produtivo depende deste inóculo produzido no interior da lavoura, é válido adotar medida(s) de manejo que promova(m) a supressão da esporulação do patógeno nos restos culturais. Os resultados obtidos em condições controladas com o uso integrado de *C. rosea* e matéria orgânica na supressão de *B. cinerea* são promissores. Entretanto, é necessária a identificação dos fatores que afetam a performance do antagonista a campo, para que seja possível estabelecer uma estratégia viável do seu uso em cultivos comerciais de roseira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Araújo, A.E. **Sobrevivência de *Botrytis cinerea* em restos de cultura, efeito de fatores de ambiente sobre o patógeno e progresso do mofo cinzento em roseiras cultivadas em casa de vegetação.** 1995. 98f. Tese (Mestrado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
2. Bettiol, W. Efeito do lodo de esgoto na incidência da podridão do colmo do milho causada por *Fusarium*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, supl., p.359, 2000.
3. Bettiol, W.; Santos, I. dos. **Efeito do lodo de esgoto sobre fitopatógenos veiculados pelo solo.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. 30p. (Documentos, 24).
4. Bettiol, W.; Camargo, O.A. (Ed.). **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 312p.
5. Braun, P.G.; Sutton, J.C. Inoculum sources of *Botrytis cinerea* in fruit rot of strawberry in Ontario. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.9, n.1, p.1-5, 1987.
6. Campbell, C.L.; Madden, L.V. Temporal analysis of epidemics I: description and comparison of disease progress curves. In:

- Campbell, C.L.; Madden, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley, 1990. cap.8, p.161-202.
7. Dubos, B. Biological control of *Botrytis*: state-of-the-art. In: Verhoeff, K.; Malathrakis, N.E.; Williamson, E.B. **Recent advances in Botrytis research**. Wageningen: PUDOC, 1992. p.169-179.
 8. Elad, Y.; Köhl, J.; Fokkema, N.J. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. **Phytopathology**, St. Paul, v.84, n.10, p.1193-1200, 1994.
 9. Fokkema, N.J. Opportunities and problems of control of foliar pathogens with micro-organisms. **Pesticide Science**, New York, v.37, n., p.411-416, 1993.
 10. Franco, D.A.S. **Efeito de fontes de matéria orgânica sobre a ferrugem do cefeieiro**. 2003. 119f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
 11. Ghini, R.; Mendes M.D.L.; Bettiol, W. Método de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) como indicador de atividade microbiana no solo e supressividade a *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, v.24, n.3/4, p. 239-242, 1998.
 12. Hammer, P.E.; Marois, J.J. Nonchemical methods for postharvest control of *Botrytis cinerea* on cut roses. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.114, n.1, p.100-106, 1989.
 13. Junqueira, A.H.; Peetz, M.S. **Análise conjuntural das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil - 1º semestre de 2004**. Campinas, 2004. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com.br/ibraflor/index.php?id=186>>. Acesso em: 20 set. 2004.
 14. Köhl J.; Fokkema N.J. Strategies for biological control of necrotrophic fungal pathogens. In: Boland G.J.; Kuykendall L.D. (Ed.). **Plant-microbe interactions and biological control**. New York: Marcel Dekker, 1998. p.49-88.
 15. Köhl, J.; Molhoek, W.M.L.; Van Der Plas, C.H.; Fokkema, N.J. Suppression of sporulation of *Botrytis* spp. as a valid biocontrol strategy. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.101, n.3, p.251-259, 1995.
 16. Lewis, J.A.; Lumsden, R.D.; Millner, P.D.; Keinath, A.P. Suppression of damping-off of peas and cotton in the field with composte sewage sludge. **Crop Protection**, Oxford, v.11, n.3, p.260-266, 1992.
 17. Millner, P.D.; Lumsden, R.D.; Lewis, J.A. Controlling plant disease with sludge compost. **Biocycle**, Emmaus, v.23, n., p.50-52, 1982.
 18. Morandi, M.A.B. **Influência de fatores bióticos e abióticos no estabelecimento de *Clonostachys rosea* em tecidos de roseira e controle biológico de *Botrytis cinerea* pelo antagonista em restos culturais**. 2001. 71f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
 19. Morandi, M.A.B.; Maffia, L.A.; Mizubuti, E.S.G.; Alfenas, A.C.; Barbosa, J.G. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component on *Botrytis* blight management in commercial greenhouses. **Biological Control**, Orlando, v.26, n.3, p.311-317, 2003.
 20. Morandi, M.A.B.; Maffia, L.A.; Sutton, J.C. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. **Phytoparasitica**, Rehovot, v.29, n.2, p.103-113, 2001.
 21. Morandi, M.A.B.; Sutton, J.C.; Maffia, L.A. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.106, n.3, p.439-448, 2000.
 22. Morandi, M.A.B.; Sutton, J.C.; Maffia, L.A. Relationships of aphid and mite infestations to control of *Botrytis cinerea* by *Clonostachys rosea* in rose (*Rosa hybrida*) leaves. **Phytoparasitica**, Rehovot, v.28, n.1, p.55-64, 2000.
 23. Olivetti, M.P.A.; Takaes, M.; Matsunaga, M. Perfil da produção das principais flores de corte no estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.24, n.1, p.31-54, 1994.
 24. Sutton, J.C.; James, T.D.W.; Rowell, P.M. Relation of weather variables and host factor to an epidemic of botrytis leaf blight in onions. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.5, n.3, p.256-265, 1983.
 25. Sutton, J.C.; Peng, G. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, n.6, p.615-621, 1993.
 26. Sutton, J.C.; Li, De-W.; Peng, G.; Yu, H.; Zhang, P.; Valdebenito-Sanhueza, R.M. *Gliocladium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, n.4, p.316-328, 1997.
 27. Tatagiba, J. da S.; Maffia, L.A.; Barreto, R.W.; Alfenas, A.C.; Sutton, J.C. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). **Phytoparasitica**, Rehovot, v.26, n.1, p.8-19, 1998.
 28. Volpin, H.; Elad, Y. Influence of calcium nutrition on susceptibility of rose flowers to botrytis blight. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, n.11, p.1390-1394, 1991.
 29. Yu, H.; Sutton, J.C. Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.19, n.3, p.237-246, 1997.
 30. Zhang, P.G.; Sutton, J.C.; Tan, W.; Hopkin, A.A. *Gliocladium roseum* reduces physiological changes associated with infection of black spruce seedlings by *Botrytis cinerea*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.18, n.1, p.7-13, 1996.