

SELEÇÃO *IN VITRO* DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea* EM *Eucalyptus benthamii*

José Antonio Sbravatti Júnior¹, Celso Garcia Auer², Ida Chapaval Pimentel³,
Álvaro Figueredo dos Santos², Bruno Schultz⁵

¹Eng. Florestal, Mestrando em Ciências Florestais, UFPR, Curitiba, Paraná, Brasil - juniorasbi@hotmail.com

²Eng. Florestal, Dr., Embrapa Florestas, Colombo, Paraná, Brasil - celso.auer@embrapa.br; alvaro.santos@embrapa.br

³Eng^a Agrônoma, Dr^a., Depto. de Patologia Básica, UFPR, Curitiba, Paraná, Brasil - ida@ufpr.br

⁵Eng. Florestal, M.Sc., Doutorando em Sensoriamento Remoto, INPE, São José dos Campos, São Paulo, Brasil - schultz.florestal@gmail.com

Recebido para publicação: 28/03/2012 – Aceito para publicação: 25/02/2013

Resumo

O *Eucalyptus benthamii* é uma das principais espécies de eucalipto plantadas na região Sul do Brasil, por sua resistência a geadas e por seu uso na produção florestal de madeira para fins energéticos. Na produção de mudas, uma das principais doenças ocorrentes em viveiros é o mofo-cinza, causado pelo fungo *Botrytis cinerea*. Uma das alternativas para o controle dessa doença é o controle biológico com fungos endofíticos, os quais podem competir com os patógenos foliares de mudas de eucalipto. O objetivo deste trabalho foi isolar os fungos endofíticos provenientes de mudas de *E. benthamii*, identificá-los e selecioná-los para o controle de *B. cinerea*. Eles foram isolados do interior de tecidos vegetais desinfectados, identificados de acordo com critérios macro e micromorfológicos e classificados a partir de testes de controle biológico *in vitro*. Os resultados evidenciaram o potencial antagonista dos fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp. Nenhum desses fungos causou lesões em mudas de *E. benthamii*.

Palavras-chave: Mofo-cinza; eucalipto; viveiro.

Abstract

In vitro selection of endophytes for biological control of *Botrytis cinerea* in *Eucalyptus benthamii*. *Eucalyptus benthamii* is one of the main eucalypt species planted in Southern Brazil, due to its resistance to frost and its use in the production of forest wood for energy purposes. During the production of seedlings, the main disease occurring in forest nurseries is gray-mold caused by the fungus *Botrytis cinerea*. One alternative for control this disease is biological control with fungal endophytes, which can compete with the foliar pathogens of eucalypt seedlings. The objective of this study was to isolate endophytic fungi from seedlings of *Eucalyptus benthamii*, identify and select them for *B. cinerea* control. These were isolated from the interior of disinfected plant tissues, identified according to macro and micromorphological criteria, and based on tests of biological control *in vitro*. The results revealed the potential antagonist of *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. and *Trichoderma* sp. No fungi caused lesions in *E. benthamii* seedlings.

Keywords: Gray-mold; eucalypt; nursery.

INTRODUÇÃO

Eucalyptus benthamii Maiden et Cabbage é natural da Austrália, encontrado em áreas limitadas ao oeste de Sydney, em planícies com solos férteis ao longo do rio Nepean e seus afluentes. Essa exigência silvicultural tornou a espécie vulnerável durante a expansão da fronteira agrícola, colocando-a em condição de espécie ameaçada de extinção no seu país de origem. Levantamentos recentes mostram a ocorrência de uma pequena população e de alguns indivíduos isolados ao longo do Rio Nepean, entre as localidades de Wallacia e Camden, e de uma população maior, localizada entre 33°49' latitude sul e 150°22' longitude oeste, em Kedumba Creek (HIGA; PEREIRA, 2003).

No Brasil, a espécie foi introduzida via semente pela Embrapa Florestas na década de 80, sendo que as mudas foram plantadas no ano de 1988, originando uma área de produção de sementes (KRATZ *et al.*, 2011). Na região Sul do país, o clima é um fator limitante para a produção florestal, fazendo-se

necessário o cultivo de espécies que apresentem maior tolerância ao frio. Em virtude da rapidez de crescimento, da boa forma do fuste, rusticidade e resistência às geadas, o *Eucalyptus benthamii* destaca-se entre as espécies do gênero. A crescente demanda por mudas estimula estudos mais detalhados sobre quais aspectos podem contribuir para o desenvolvimento de *E. benthamii* em condições de viveiro (SCHULTZ, 2011).

De acordo com Auer e Santos (2011), durante a produção de mudas de eucalipto em viveiros florestais, podem ocorrer ataques de patógenos, principalmente de fungos, causando doenças importantes que reduzem a produção, além de causarem significativos impactos econômicos, de acordo com a espécie atacada e da época do ano.

As mudas de eucalipto estão sujeitas a mais de uma dezena de doenças fúngicas. Entre as principais doenças que ocorrem em viveiros de eucalipto na região Sul do Brasil, pode-se destacar o mofo-cinza, causado pelo agente etiológico *Botrytis cinerea* Pers.: Fr, em função da elevada umidade, juvenildade e proximidade das mudas (BIZI, 2006).

Segundo Alfenas *et al.* (2009), o *B. cinerea* (mofo-cinza) causa morte de mudas em reboleiras ou distribuídas aleatoriamente nos canteiros. Posteriormente, surge abundante esporulação de coloração cinza sobre estacas, miniestacas ou microestacas mortas, folhas e brotações infectadas.

Essa doença pode causar um alto percentual de perdas, sendo necessário algum tipo de controle, normalmente feito por meio de produtos químicos e por manejo integrado. De acordo com Bizi *et al.* (2005), o controle químico em viveiros florestais utiliza os mesmos produtos recomendados para a área agrícola, no entanto não existem fungicidas registrados para a cultura de eucalipto.

Considerando a constante demanda por parte dos viveiristas e produtores por recomendações de controle, aliada à ausência de produtos químicos registrados, torna-se interessante um direcionamento das pesquisas para o controle alternativo dessas doenças (BIZI, 2006).

Uma das alternativas é o controle biológico com microrganismos endofíticos, que são agentes antagonistas capazes de penetrar na planta e se disseminar sistematicamente no hospedeiro sem causar doença, mas impedindo o avanço dos patógenos. (ARAÚJO *et al.*, 2002). Para *B. cinerea*, existem alguns relatos de estudos com microrganismos para controle biológico em condições brasileiras, porém nenhum deles trata dos fungos endofíticos.

Com essa perspectiva, o objetivo deste trabalho foi isolar os fungos endofíticos provenientes de mudas de *E. benthamii*, identificá-los e selecioná-los conforme seu potencial para controle do patógeno *B. cinerea*.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado entre outubro de 2009 e junho de 2010, no Laboratório de Microbiologia, Patologia e Parasitologia da Universidade Federal do Paraná e no Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, respectivamente localizados nas cidades de Curitiba e Colombo, PR.

Material vegetal utilizado

Foram utilizadas 30 mudas sadias de *E. benthamii* com três meses de idade, procedentes de viveiro comercial, formadas com sementes de área de produção de sementes (APS), localizada no município de Guarapuava, PR. As mudas foram produzidas em tubetes de 50 cm³ preenchidos com substrato comercial à base de vermiculita e casca de pínus. Na casa de vegetação, as mudas foram acondicionadas em bandejas e mantidas com irrigação manual, apenas molhando-se o substrato.

Os lotes de mudas sadias foram utilizados para o isolamento dos fungos endofíticos e também para os testes de inoculação com o patógeno *Botrytis cinerea*.

Isolamento dos fungos endofíticos

Inicialmente, procedeu-se à confecção de discos de folhas contendo a nervura central e de segmentos de hastas das mudas de *E. benthamii*, cada amostra individual com cerca de 1 cm² de área. Ao se tratar de fungos endofíticos, é necessário realizar uma técnica de desinfecção superficial, que foi realizada utilizando o seguinte protocolo, descrito em Araújo *et al.* (2002):

- a) lavagem das amostras em água corrente para a retirada de resíduos de poeira e solo;
- b) corte das amostras em fragmentos;

- c) imersão em solução de álcool 70% por 1 minuto;
- d) imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% por 3-4 minutos;
- e) imersão em solução de álcool 70% por 30 segundos;
- f) enxágue por duas vezes em água destilada e esterilizada.

Após esse processo, 3 discos foliares e 3 segmentos de haste de cada muda foram colocados em placas de Petri contendo meio BDA (ágar-batata dextrosado comercial, 39 g; 1000 mL), com a parte superior da folha virada para cima. As placas foram incubadas em BOD a 25 °C, no escuro. Com o surgimento das colônias, elas foram purificadas para posterior identificação. Parte dos isolados foi transferida individualmente para tubos de ensaio contendo BDA, cultivados por sete dias e recobertos com óleo mineral estéril, identificados e mantidos para preservação em refrigeração a 4 °C no Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas.

Identificação taxonômica dos fungos endofíticos

Primeiramente, os isolados foram separados em grupos denominados morfotipos, conforme a morfologia microscópica. Após essa primeira divisão em morfotipos, foi realizada a técnica de microcultivo (KERN; BLEVINS, 1999) de uma colônia de cada grupo morfologicamente semelhante. Lâminas de sete e 14 dias obtidas do microcultivo foram utilizadas para a identificação dos fungos e sua classificação, realizada através de observações de corpos de frutificação ao microscópio óptico (400x) e da utilização de literatura especializada (KLICH; PITT, 1988; BARNETT; HUNTER, 1987; LARONE, 1987; HAZEN *et al.*, 1973; MENEZES; OLIVEIRA, 1993; KERN, 1988; HERRERA; ULLOA, 1990).

Técnica do microcultivo (KERN; BLEVINS, 1999)

Para essa técnica, foram utilizadas placas de Petri esterilizadas, contendo em seu interior uma lâmina e um pedaço de algodão. Um cubo de aproximadamente 1 cm³ de meio de cultura BDA foi cortado e colocado sobre uma lâmina contida no interior da placa. O fungo é repicado em todos os lados do cubo, o qual será posteriormente coberto por uma lamínula esterilizada. O algodão no interior é umedecido com água destilada esterilizada e a placa mantida em estufa incubadora por 7 a 14 dias, a aproximadamente 28 °C. Após o tempo determinado, a lamínula foi retirada e colocada sobre outra lâmina limpa contendo uma gota de lactofenol de Amann, sendo as bordas vedadas com esmalte. As lâminas preparadas foram observadas em microscópio óptico.

Obtenção de inóculo de *Botrytis cinerea*

O isolado utilizado nos experimentos foi obtido a partir de mudas de *E. benthamii* doentes, procedentes de viveiro comercial. O patógeno foi isolado pelo método direto, ou seja, sob a lupa e com o auxílio de um estilete, foram recolhidos micélio e conídios do patógeno, que posteriormente foram transferidos para placas de Petri com meio BDA. Foram preparados três isolados monospóricos, multiplicados também em meio BDA, e mantidos em câmara BOD à temperatura de 25 °C (ALFENAS *et al.*, 2009), até produzirem conídios para a inoculação. Esse isolado foi selecionado e utilizado nos experimentos por apresentar um bom crescimento e esporulação *in vitro*.

Pareamento de culturas

Nessa etapa, foi utilizada a técnica de cultura pareada (MARIANO, 1993) para avaliação do antagonismo dos isolados endofíticos contra fitopatógenos, respeitando-se o tempo de crescimento dos isolados e fitopatógenos avaliados. Para este estudo, foram escolhidos somente os endofíticos identificados, em número de nove isolados.

Os discos contendo micélio e/ou conídios dos isolados endofíticos e do patógeno foram obtidos de colônias crescidas em meio BDA, durante sete dias, incubadas em câmara BOD, com temperatura de 25 °C. Após esse período, os discos foram retirados da borda das colônias, com diâmetro inicial de dez milímetros. Os discos do endófito e do patógeno foram posicionados em extremidades opostas da placa de Petri contendo meio BDA e novamente incubados em câmara BOD por um período de 14 dias. Foram realizadas duas avaliações, uma aos sete dias e a outra no final do período, equivalente ao intervalo de tempo em que o micélio do patógeno atingiu o crescimento máximo na presença dos fungos antagonísticos. Após o período de incubação, a análise foi realizada por meio da medição dos diâmetros médios das

culturas. Neste ensaio, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo que cada placa de Petri constituiu-se em uma unidade experimental. Os testes estatísticos foram realizados pelo Programa Assistat 7.6 (SILVA; AZEVEDO, 2009).

Para determinar a porcentagem de inibição do crescimento do patógeno, mediu-se o diâmetro das colônias, subtraindo-se o diâmetro do disco de micélio inicial (QUIROGA *et al.*, 2001) e calculada de acordo com Edginton *et al.* (1971), pela fórmula:

$$\text{- Porcentagem de inibição (PI\%)} = (\text{Dc} - \text{Dt} / \text{Dc}) \times 100$$

em que Dc é o diâmetro médio da colônia do patógeno das placas testemunhas (sem antagonista) e Dt é o diâmetro médio da colônia do patógenos frente ao antagonista (isolado endofítico).

Testes de patogenicidade dos fungos endofíticos

Os fungos endofíticos selecionados nos testes de antagonismo foram testados quanto à sua patogenicidade ao *E. benthamii*. Para esse teste, empregou-se metodologia similar aos estudos de patogenicidade em *Ilex* e *Eucalyptus* feitos por Lau e Grigoletti Júnior (1997). Foram utilizadas dez mudas de *E. benthamii* por tratamento, sadias, vigorosas e uniformes em altura e número de folhas, que foram distribuídas em caixas plásticas (40 x 60 x 35 cm). Uma camada aproximada de 10 cm de vermiculita expandida umedecida foi colocada no fundo das caixas, para separá-las, mantê-las em posição vertical e para facilitar a formação da câmara úmida. As caixas permaneceram encobertas com tampas, formando a câmara úmida, durante o período de incubação de 14 dias, em casa de vegetação, sem controle de temperatura.

A inoculação dos fungos endofíticos F3 (*Aspergillus* sp.), F6 (*Trichoderma* sp.) e F29 (*Penicillium* sp.), selecionados nos testes de antagonismo, foi feita através de pulverização com uma suspensão de esporos, obtida por meio da lavagem com água ultrapurificada de colônias cultivadas em placas de Petri com meio BDA, durante vinte dias, com temperatura de 25 °C, em condições de laboratório. A concentração de esporos da suspensão do isolado F3 foi de $5,5 \times 10^4$ conídios/mL, de $2,4 \times 10^4$ conídios/mL para o isolado F29 e de $2,7 \times 10^4$ conídios/mL para o isolado F6.

A avaliação da patogenicidade foi feita dez dias após a inoculação dos fungos endofíticos, verificando-se a presença de sintomas. O reisolamento foi feito em meio BDA, para a confirmação da patogenicidade do endófito testado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento dos fungos endofíticos

Foram isolados 62 fungos endofíticos, agrupados em 11 morfotipos, dos quais foram identificados somente nove isolados: *Alternaria* sp., *Amblyosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Trichoderma* sp., presentes em discos foliares, e *Pestalotiopsis* sp. e *Phoma* sp., presentes em segmentos de hastes. O restante dos fungos não foi identificado, por falta de estruturas reprodutivas. Destaque dado para o fungo *Helminthosporium* sp., que foi identificado nos dois tipos de amostras (Tabela 1). A maioria dos isolados foi obtida de discos de folhas (35), e o restante dos segmentos de hastes (27).

Tabela 1. Relação de fungos endofíticos isolados de folhas e hastes de mudas de *Eucalyptus benthamii*.

Table 1. List of endophytic fungi isolated from leaves and stems of *Eucalyptus benthamii*.

Antagonista	Fungo	Número de isolados	Frequência (%)	Origem
F-13	<i>Alternaria</i> sp.	16	25,83	Disco foliar
F-30	<i>Amblyosporium</i> sp.	01	1,61	Disco foliar
F-3	<i>Aspergillus</i> sp.	02	3,22	Disco foliar
H-9	<i>Helminthosporium</i> sp.	35	56,45	Segmento de haste/ Disco foliar
F-29	<i>Penicillium</i> sp.	04	6,45	Disco foliar
H-18	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	01	1,61	Segmento de haste
H-22	<i>Phoma</i> sp.	01	1,61	Segmento de haste
F-14	<i>Rhizoctonia</i> sp.	01	1,61	Disco foliar
F-6	<i>Trichoderma</i> sp.	01	1,61	Disco foliar

Teste de antagonismo

Os testes realizados através do método *in vitro* revelaram o potencial antagonista de alguns fungos endofíticos contra *B. cinerea*, constatado através da sobreposição das colônias de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp., que reduziram o crescimento micelial do patógeno (Tabela 2). Contudo, o pareamento de alguns endofíticos apresentou resultados negativos, ou seja, estimulou o crescimento da colônia de *B. cinerea* (Tabela 2). Esse resultado contraditório pode ser explicado por sinergia decorrente da produção de substâncias estimuladoras entre fungos (AZEVEDO, 1998).

Especificamente contra o mofo-cinzento, Sanfuentes e Ferreira (1996) testaram *Gliocladium roseum* (*Clonostachys rosea*), *Penicillium* sp., *Trichoderma harzianum*, *T. viride* e dois isolados de *Trichoderma* sp. para a supressão de *B. cinerea* em mudas de eucalipto. O melhor resultado foi obtido no tratamento com *G. roseum*.

Mercader *et al.* (2006) isolou 71 fungos endofíticos de *Eucalyptus globulus* e os testou em ensaios de biocontrole *in vitro* contra *Botrytis cinerea*. Entre eles, *Clonostachys* sp., *Penicillium* sp. e 4 isolados de *Trichoderma* sp. apresentaram bons resultados na supressão das colônias de *B. cinerea*, confirmando a sua eficácia como agentes de biocontrole do fungo causador do mofo-cinzento.

As atividades antagonistas para reduzir a colonização e esporulação do patógeno nessas condições demonstram que esses fungos possuem uma rápida germinação e iniciam a atividade antagonista de forma oportuna (SUTTON; PENG, 1993).

Apesar de obter bons resultados da atividade antagonista *in vitro*, isso não corresponde à garantia da redução de doenças no campo (BETTIOL, 1991). No entanto, Kupper *et al.* (2003) relata que diversas vezes a eficácia dos antagonistas *in vitro* ou em casa de vegetação pode ser insuficiente para estabelecer o limiar de população exigida para um biocontrole no campo, mas pode servir como indicativo da viabilidade no controle de fitopatógenos sob condições naturais de infecção.

Tabela 2. Inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* após teste de pareamento em meio BDA com nove endofíticos isolados de folhas e hastes de *E. benthamii*.

Table 2. Inhibition of *Botrytis cinerea* mycelial growth after pairings test on PDA with nine endophytic isolated from leaves and stems of *E. benthamii*.

Fungos testados	Diâmetro médio das colônias do fitopatógeno (mm)	Percentual de inibição (%)
<i>Trichoderma</i> sp.	26,2 a*	16,5
<i>Penicillium</i> sp.	26,6 ab	6,36
<i>Aspergillus</i> sp.	30 b	4,45
<i>Alternaria</i> sp.	32,4 c	0,8917
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	37,6 c	0,8917
Testemunha	31,4 c	0
<i>Rhizoctonia</i> sp.	42 c	-33,7
<i>Helminthosporium</i> sp.	43,4 c	-38,2
<i>Amblyosporium</i> sp.	51 c	-62,4
<i>Phoma</i> sp.	54,2 c	-72,6

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de significância. Percentual de inibição negativo significa que houve estímulo ao crescimento do patógeno. CV: 11,1%.

Testes de patogenicidade

As inoculações com os endofíticos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp. realizadas em mudas de *E. benthamii* não produziram lesões foliares após o período de incubação. Desse modo, verificou-se que esses fungos não são patogênicos em folhas de *E. benthamii* e podem ser utilizados para testes de antagonismo em viveiros florestais. Segundo Azevedo (1998), é difícil estabelecer um limite definido entre microrganismos endofíticos e patogênicos, sendo que algumas vezes certos endofíticos que não causam sintomas aparentes em determinado hospedeiro podem agir como patógenos em outros. A partir disso, os testes de patogenicidade visaram evidenciar qual seriam os efeitos na muda após a inoculação dos fungos endofíticos selecionados nos testes de antagonismo.

A partir dos testes de antagonismo e da ausência de patogenicidade dos endofíticos testados, pôde-se evidenciar o potencial de controle para uma próxima etapa, que englobaria os testes *in vivo* e sua comparação com um fungicida.

CONCLUSÕES

Os fungos endofíticos inibiram o crescimento *in vitro* de *Botrytis cinerea* e não causaram lesões foliares em *Eucalyptus benthamii*, podendo ser testados para o controle do mofo-cinza em mudas dessa espécie. Destes, podem ser indicados como potenciais controladores os fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças de eucalipto**. Viçosa, MG: UFV, 2009. 500 p.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUKINSKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P. T. **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2002. 86 p.
- AUER, C. G.; SANTOS, A. F. dos. Doenças em eucaliptos destinados à produção de energia na região Sul do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 31, p. 373 - 379, 2011.
- AZEVEDO, J. L. Micro-organismos endofíticos. In: MELLO, I. S. and AZEVEDO, J. L. (ed.). **Ecologia microbiana**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, 1998. p. 17 - 137.
- BARNETT, H. C.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3. ed., Minneapolis: Burgess Publications, 1987. p. 218.
- BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: Bettiol, W. org. **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Embrapa - CNPDA. Jaguariúna, 1991. p. 223 - 236.
- BIZI, R. M. **Alternativa de controle do mofo-cinza e do oídio em mudas de eucalipto**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- BIZI, R. M.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G. Seleção de fungicidas para controle de oídio em eucalipto. **Boletim de pesquisa florestal** – Unidade Regional de Pesquisa Florestal, Embrapa Florestas, Colombo/PR, v. 51, n. jul./dez., p. 165 - 170, 2005.
- EDGINTON, L. V.; KNEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 62, n. 7, p. 42 - 44, 1971.
- HAZEN, E. L.; GORDON, M. A.; REED, F. C. **Laboratory identification of pathogenic fungi simplified**. 3 ed, Springfield (USA): Charles C. Thomas, 1973.
- HERRERA, T.; ULLOA, M. **El reino de los hongos**. Micología básica y aplicada. 1. ed, México, 1990.
- HIGA, R. C. V.; PEREIRA, J. C. D. Usos potenciais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage. **Comunicado Técnico no. 100 Embrapa Florestas**, Colombo, 4 p., 2003.
- KERN, M. E. **Medical mycology: a self-instructional text**. 3. ed. Philadelphia: F.A. Davis Company, 1988.
- KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia médica** – Texto e Atlas. 2. ed, São Paulo: Editorial Premier, 1999.
- KLICH, M. A.; PITT, J. I. Common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Australia: **Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization**, 116 p., 1988.
- KRATZ, D. **Substratos renováveis para produção de mudas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage e *Mimosa scabrella* Benth.** 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

- KUPPER, K. C.; FERNANDES, N. G.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 251 - 257, 2003.
- LARONE, D. H. **Medically important fungi: a guide to identification**. 2. ed. New York: Elsevier, 1987.
- LAU, D.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Patogenicidade de *Cylindrocladium spathulatum* em espécies de *Ilex* e *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22., Supl., p. 274, 1997.
- MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 1, p. 69 - 409, 1993.
- MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos fitopatogênicos**. Pernambuco: UFRPE (imprensa Universitária), 1993. 277 p.
- MERCADER, G. M.; FLORES, S. Z.; VARGAS, G. G.; STOWASSER, S. V. **Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile**. *Bosque*, 27 (2): 126 - 134, 2006.
- PICCININ, E.; PASCHOLATI, S. F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Botrytis cinerea* em mudas de eucalipto. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 28, 1995. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, suplemento, p. 385. 1995.
- QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 89 - 96, 2001.
- SANFUENTES, E.; FERREIRA, F. A. Fungos para a supressão de *Botrytis cinerea* em mudas de eucalipto. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 26, 1996. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, suplemento, p. 281. 1996.
- SCHULTZ, B. **Doenças bióticas e abióticas em *Eucalyptus benthamii* Maiden**. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012. (No prelo).
- SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: **Anais...** American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.
- SUTTON, J.; PENG, G.; Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. **Phytopathology** 83: 615 - 621, 1993.

