

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOSÉ ANTONIO SBRAVATTI JUNIOR

**SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PARA O CONTROLE  
BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea* Pers.: Fr EM MUDAS DE *Eucalyptus  
benthamii* Maiden et Cabbage**

CURITIBA  
2013

JOSÉ ANTONIO SBRAVATTI JUNIOR

**SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PARA O CONTROLE  
BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea* Pers.: Fr EM MUDAS DE *Eucalyptus  
benthamii* Maiden et Cabbage**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Engenharia Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Co-orientadores:

Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos

Profa. Dra. Ida Chapaval Pimentel

CURITIBA

2013

Ficha catalográfica elaborada por Denis Uezu – CRB 1720/PR

Sbravatti Junior, José Antonio

Seleção de fungos endofíticos para o controle biológico de *Botrytis cinerea*  
Pers.: Fr em mudas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage / José Antonio  
Sbravatti Junior. – 2013  
54 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Coorientadores: Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ida Chapaval Pimentel

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências  
Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Defesa:  
Curitiba, 25/06/2013.

Área de concentração: Silvicultura.

1. Fungos. 2. Eucalipto – Doenças e pragas. 3. *Botrytis cinerea*. 4. Pragas –  
controle biológico. 5. Teses. I. Auer, Celso Garcia. II. Santos, Álvaro Figueredo  
dos. III. Pimentel, Ida Chapaval. IV. Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Agrárias. V. Título.

CDD – 632.96

CDU – 632.937



Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências Agrárias - Centro de Ciências Florestais e da Madeira  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal

**PARECER**

Defesa nº. 976

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, após argüir o(a) mestrando(a) *José Antonio Sbravatti Junior* em relação ao seu trabalho de dissertação intitulado "**SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea Pers.: Fr* EM MUDAS DE *Eucalyptus benthamii Maiden et Cambage***", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de *Mestre* em Engenharia Florestal, área de concentração em SILVICULTURA.

Dr. Patricia do Rocio Dalzoto  
Universidade Federal do Paraná  
Primeiro examinador

Dr. Nilton José Sousa  
Universidade Federal do Paraná  
Segundo examinador

Dr. Celso Garcia Auer  
Universidade Federal do Paraná  
Orientador e presidente da banca examinadora



Curitiba, 25 de junho de 2013.

Antonio Carlos Batista  
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal  
Carlos Roberto Sanquetta  
Vice-coordenador do curso

*À minha mãe Mirian Ruth Nadolny Sbravatti,  
por sempre acreditar no meu potencial e me  
prestar incondicional apoio e incentivo em todos os  
momentos da minha vida.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as minhas conquistas.

Aos meus padrinhos José Ribeiro Teixeira e Alice Bernadete Teixeira, por sempre me incentivarem e apoiarem ao longo desta caminhada.

À minha namorada Thais Arzão, por estar do meu lado todos os dias, me ajudando, apoiando, compreendendo e sacrificando momentos em nome desta minha conquista.

À minha irmã Joicy Bohrer, meu cunhado Alessandro Bohrer e meus lindos afilhados, três das maiores felicidades da minha vida: Alexandre, André e Rodrigo.

Ao amigo Prof. Dr. Celso Garcia Auer, pela grande amizade, paciência, compreensão, conselhos e orientação nestes quatro anos de jornada.

Ao Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos pela amizade e orientação.

Aos colegas: Bruno Schultz, Francine Bontorin, Paula Rachel Rabelo Correa, Karen Christiane Bora, Hágata Siqueira, José Carlos e Pedro Henrique Riboldi Monteiro pela amizade e ajuda nestes dois anos de trabalho. Aos funcionários do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, Davi Veiga e Caroline Bühler pela ajuda na condução dos experimentos e amizade.

Aos funcionários do viveiro Golden Tree pela ajuda no fornecimento de material vegetal para análise.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal da UFPR.

À Embrapa Florestas, pelo suporte para desenvolvimento do meu projeto.

À CAPES-REUNI, pela concessão da bolsa.

Aos demais familiares, pelo apoio e paciência nesta fase da minha vida.

Aos amigos de graduação, de especialização em Engenharia de Segurança do Trabalho e do litoral, por sempre me incentivarem, e por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

*A luta por um ideal abre a porta da caminhada. Humildade faz com que essa porta não seja fechada.*

*(José Sabino Pereira, Projota)*

## RESUMO

*Eucalyptus benthamii* é uma das principais espécies de eucalipto plantadas na região sul do Brasil, por sua resistência à 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 cinzento, 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 na filosfera 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 do *B. cinerea*. Estes foram isolados do interior de tecidos vegetais desinfectados, provenientes de mudas com three meses de idade coletadas de um viveiro comercial no município de Guarapuava-PR e, identificados de acordo com critérios macro e micromorfológicos. Foram isolados 62 fungos endofíticos, sendo 35 de discos foliares e 27 de segmentos de hastes. Nove gêneros foram identificados: *Alternaria* sp., *Amblyosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Trichoderma* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phoma* sp. e *Helminthosporium* sp. Para a seleção dos endofíticos com potencial de controle, os testes foram realizados em duas etapas: *in vitro* e *in vivo*. Os resultados do primeiro teste, que consistiram no pareamento entre os fungos endofíticos e o patógeno, evidenciaram o potencial antagonista dos fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp. Posteriormente, fez-se um teste de eficiência que consistiu na inoculação de mudas de *E. benthamii* com uma suspensão de esporos dos fungos previamente a inoculação de *B. cinerea*, comparando sua eficiência com o fungicida iprodione. As mudas foram incubadas em câmara úmida a  $25 \pm 1^\circ \text{C}$ , dentro caixas plásticas no interior de uma casa de vegetação, por 21 dias. Avaliou-se a colonização do patógeno na parte aérea da muda com uma escala que variou de 0 (sem sintoma) a 4 (infecção severa). Houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo que depois do fungicida, o endófito com maior potencial de controle foi o *Trichoderma* sp., seguido de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

Palavras-chave: Mofo cinzento; eucalipto; viveiro



## ABSTRACT

*Eucalyptus benthamii* is one of the main species of eucalyptus planted in Southern Brazil, for its resistance to frost and its use in the production of forest wood for energy purposes. During seedling production, a major disease occurring in nurseries is gray mold, caused by the fungus *Botrytis cinerea*. One of the alternatives to control this disease is biological control with endophytic fungi, which can compete with the pathogens in the phyllosphere of *Eucalyptus*. The aim of this study was to isolate endophytic fungi from seedlings of *E. benthamii*, identifying and selecting for control of *B. cinerea*. These were isolated from the inner tissues of plants disinfected from plants with three months old collected from a commercial nursery in Guarapuava-PR, and identified according to macro and micromorphological criteria. Sixty two endophytic fungi were isolated, 35 from leaf disk and 27 from stem segments. Nine genera were identified: *Alternaria* sp., *Amblyosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Trichoderma* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phoma* sp. and *Helminthosporium* sp. For the selection of endophytes with potential control, the tests were performed in two stages: biological control *in vitro* and *in vivo*. The results of the first test, which consisted of pairing endophytes and pathogen, showed the potential antagonist of *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. and *Trichoderma* sp. After, a test of efficiency which consisted of inoculation of seedlings of *E. benthamii* with a spore suspension of fungi prior to inoculation with *B. cinerea*, was performed to compare their performance with the fungicide iprodione. The seedlings were incubated in a moist chamber at  $25 \pm 1$  ° C in plastic boxes inside a greenhouse, for 21 days. We evaluated the colonization of the pathogen in the shoots of change with a scale ranging from 0 (no symptoms) to 4 (severe infection). There were significant differences among treatments, and after the fungicide the endophyte with the greatest potential control was *Trichoderma* sp., followed by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp.

Keywords: Mold-gray; eucalyptus; nursery

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 – A: MUDA DE *E. benthamii* COM TRÊS MESES DE IDADE E TERÇO SUPERIOR CONTENDO OS TRÊS PRIMEIROS PARES DE FOLHAS; B: INSTALAÇÕES DO VIVEIRO COMERCIAL PRODUTOR DAS MUDAS DE *E. benthamii* CEDIDAS PARA ESTUDO; C: LOTE DE MUDAS DE *E. benthamii* UTILIZADAS NO EXPERIMENTO.....23
- FIGURA 2 - ISOLADO BG02 DE *Botrytis cinerea*. A: CÂMARA ÚMIDA COM MUDAS DOENTES PARA ISOLAMENTO; B: CULTURA MONOSPÓRICA EM MEIO BDA; C: ESTRUTURAS REPRODUTIVAS DO FUNGO EM MICROSCÓPIO ESTEREOSCÓPIO A 20x; D: a) CONIDIÓFORO EM AUMENTO DE 400x E b) CONÍDIOS.....26
- FIGURA 3 - PRODUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DO INÓCULO DO ISOLADO BG02 DE *Botrytis cinerea*: A: FRASCO CONTENDO BROTAÇÕES DE *Eucalyptus benthamii* LOGO APÓS A AUTOCLAVAGEM; B: FRASCOS CONTENDO BROTAÇÕES RECOBERTAS POR Densa ESPORULAÇÃO DO FUNGO.....27
- FIGURA 4 - CAIXAS PLÁSTICAS UTILIZADAS PARA O TESTE DE PATOGENICIDADE E DE CONTROLE COM OS ENDÓFITOS.....30
- FIGURA 5 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA DISPOSIÇÃO DOS TRATAMENTOS TESTEMUNHA ÁGUA, TESTEMUNHA *Botrytis cinerea*, ISOLADOS ENDOFÍTICOS F3, F29, F6 E FUNGICIDA IPRODIONE.....33
- FIGURA 6 - MACROMORFOLOGIA DA COLÔNIA (VERSO E REVERSO) DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS CULTIVADAS EM MEIO BDA A 28 °C, POR 14 DIAS: A: *Alternaria* sp. – isolado F13; B: *Amblyosporium* sp. - isolado F30; C: *Aspergillus* sp. - isolado F3; D: *Helminthosporium* sp. - isolado H9; E: *Penicillium* sp. - isolado F29; F: *Pestalotiopsis* sp. - isolado H18; G: *Phoma* sp. - isolado H22; H: *Rhizoctonia* sp. - isolado F14; I: *Trichoderma* sp. - isolado F6.....37
- FIGURA 7 - TESTE DE ANTAGONISMO POR MEIO DO PAREAMENTO DE CULTURAS: A: *Botrytis cinerea* x *Botrytis cinerea* (testemunha); B: *Aspergillus* sp. x *Botrytis cinerea*; C: *Helminthosporium* sp. x *Botrytis cinerea*; D: *Trichoderma* sp. x *Botrytis cinerea*.....39

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS TRATAMENTOS COM OS ENDÓFITOS F3, F29, F6 E FUNGICIDA IPRADIONE CONTRA <i>Botrytis cinerea</i> , NOS DIFERENTES TEMPOS DE INOCULAÇÃO. ....	34
TABELA 2 - IDENTIFICAÇÃO E FREQUÊNCIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FOLHAS E HASTES DE MUDAS DE <i>Eucalyptus benthamii</i> . Guarapuava-PR, 2009. ....	36
TABELA 3 - DIÂMETRO MÉDIO DAS COLÔNIAS (mm) E INIBIÇÃO (%) DO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>Botrytis cinerea</i> , APÓS TESTE DE PAREAMENTO EM MEIO BDA COM OS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FOLHAS E HASTES DE <i>Eucalyptus benthamii</i> . ....	38
TABELA 4 - SEVERIDADE MÉDIA E CONTROLE (%) DE MOFO CINZENTO EM MUDAS DE <i>Eucalyptus benthamii</i> , TRATADAS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS E IPRADIONE, EM TRÊS TEMPOS DE INOCULAÇÃO DO PATÓGENO <i>Botrytis cinerea</i> , APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO. ....	42

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>viii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
3.1 <i>Eucalyptus benthamii</i> Maiden et Cabbage.....	13
3.2 DOENÇAS DO EUCALIPTO EM FASE DE VIVEIRO .....	14
3.3 MOFO CINZENTO CAUSADO POR <i>Botrytis cinerea</i> .....	15
3.3.1 Etiologia, Disseminação e Condições Favoráveis .....	16
3.3.2 Sintomatologia .....	17
3.3.3 Controle .....	17
3.5 CONTROLE BIOLÓGICO .....	18
3.4 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS.....	20
4.1 OBTENÇÃO DE MATERIAL VEGETAL PARA OS ISOLAMENTOS.....	22
4.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	23
4.3 IDENTIFICAÇÃO MACROSCÓPICA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	24
4.5 OBTENÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DO INÓCULO DE <i>Botrytis cinerea</i> .....	25
4.5.1 Determinação da Concentração de <i>Botrytis cinerea</i> .....	28

4.6 PAREAMENTO DE CULTURAS DE <i>Botrytis cinerea</i> COM FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	28
4.7 TESTE DE PATOGENICIDADE COM FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	29
4.8 TESTE DE CONTROLE DE <i>Botrytis cinerea</i> COM FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	30
5.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	36
5.2 PAREAMENTO DE CULTURAS DE <i>Botrytis cinerea</i> COM FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	38
5.3 TESTE DE PATOGENICIDADE COM FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	40
5.4 TESTE DE CONTROLE DE <i>Botrytis cinerea</i> COM FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	41

## 1 INTRODUÇÃO

A expansão dos plantios florestais no Brasil foi muito significativa no período 2005-2011, expresso pelo crescimento acumulado de 27,9 %. Em 2011, a área ocupada por plantios florestais de *Eucalyptus* e *Pinus* no Brasil totalizou 6.515.844 ha, sendo 74,8 % correspondente à área de plantios de *Eucalyptus*, que teve um crescimento de 9,4 % no período entre 2004 e 2011 (ABRAF, 2012). A facilidade de seu manejo, a sua adaptabilidade em várias regiões bioclimáticas e a geração de matéria-prima que atende diversos setores da cadeia produtiva da madeira, justificam a expansão das áreas plantadas com eucalipto no país.

Tendo como base as condições climáticas de frio na região Sul do Brasil, a eucaliptocultura torna-se limitada e restrita. Em algumas áreas nem as espécies que são tolerantes conseguem se adaptar às severas condições climáticas devido à ação de geadas (SCHULTZ, 2011).

Para atender a necessidade de se plantar espécies com maior tolerância ao frio, *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage foi introduzido na região Sul do Brasil. É uma espécie originária de região fria na Austrália e tornou-se uma das mais promissoras para ser plantada em áreas que tem a sua produção limitada devido às condições climáticas rigorosas.

Em virtude da rapidez de crescimento, da boa forma do fuste, rusticidade e resistência às geadas frequentes nesta região, *Eucalyptus benthamii* destaca-se entre as espécies do gênero, apresentando uma grande demanda na sua produção de mudas. Esta crescente demanda estimulou estudos mais detalhados sobre quais aspectos que podem contribuir para o desenvolvimento desta espécie 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 ataque de fungos, causando doenças importantes que reduzem a produção, além de causar significativos impactos econômicos, de acordo com a espécie atacada e da época do ano.

As mudas de eucalipto estão sujeitas a mais de dez tipos diferentes de doenças fúngicas. Dentre as principais doenças que ocorrem em viveiros de

eucalipto na região Sul do Brasil, pode-se destacar o mofo cinzento, causado pelo fungo *Botrytis cinerea* Pers.:Fr, em função da elevada umidade, juvenildade e proximidade das mudas (BIZI, 2006).

Segundo Alfenas *et al.* (2009), *Botrytis cinerea* 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.

Esta 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, devem ser utilizados em viveiros somente em caso de elevada incidência da doença, pois não existem fungicidas registrados para a cultura de eucalipto. Aliado a este fator e considerando a constante demanda por parte dos viveiristas e produtores por recomendações de controle, 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. A descoberta destes agentes antagonistas mudou o rumo das pesquisas que buscam agentes capazes de fazer este tipo de controle, pois apresentam da mesma forma que os fitopatógenos, a capacidade de penetrar na planta e se disseminar sistematicamente no hospedeiro sem causar doença (ARAÚJO *et al.*, 2002).

Existem alguns relatos de estudos com microrganismos para controle biológico do mofo cinzento, em condições brasileiras. Foram estudados *Clonostachys rosea* em roseiras (MORANDI, 2001) e fúcsia (SILVERA-PÉREZ, 2006), *Trichoderma* e *Gliocladium* em tomates (LISBOA *et al.*, 2007) e, *Trichoderma* e *Lecanicillium* em eucalipto (BIZI, 2006). Porém, nenhum deles trata dos fungos endofíticos para o controle biológico de *Botrytis cinerea*.

Com esta perspectiva, este trabalho visou o controle de mofo cinzento com fungos endofíticos em mudas de *Eucalyptus benthamii*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi selecionar fungos endofíticos de mudas de *Eucalyptus benthamii* visando o controle biológico do mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar fungos endofíticos a partir de mudas de *Eucalyptus benthamii*;
- Identificar os isolados por meio de macro e micromorfologia;
- Desenvolver testes *in vitro* e *in vivo* para o controle biológico do mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea*;
- Selecionar os fungos endofíticos mais eficientes para o controle da doença.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage

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

O clima da região onde a população da região Sul da Austrália encontra-se localizada é quente e úmido, com 4 a 10 geadas por ano e com a média anual de chuvas variando de 720 a 890 mm. Na região nordeste ao Rio Nepean, onde está localizada a outra população, as temperaturas do verão são comparáveis às da região Sul, mas o inverno é mais frio, com 30 a 40 geadas por ano. Apresenta alta incidência de chuvas, em torno de 2.030 mm por ano e, o mês mais seco com aproximadamente 80 mm de chuva. Este eucalipto se adapta melhor em planícies de rios ou ladeiras brandas (HIGA; PEREIRA, 2003).

Nas localidades de origem, a espécie se desenvolve melhor em solos de várzeas (neossolo flúvico) apropriados para cultivos agrícolas, frequentemente contendo fração argila a uma profundidade variável de 45 a 100 cm (HALL e BROOKER<sup>1</sup>, 1973 apud PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006).

No Brasil, em 1988, a Embrapa Florestas importou sementes de *Eucalyptus benthamii* da Austrália e, a partir destas, constituiu uma área de produção de sementes no município de Colombo, PR. Através das sementes produzidas, mais de 800 ha de *Eucalyptus benthamii* já foram implantados em

---

<sup>1</sup> HALL, N.; BROOKER, I. **Camden White Gum: *Eucalyptus benthamii*** Maiden et Cabbage. Canberra: Department of National Development Forestry and Timber Bureau, 1973. 4 p. (Forest Tree Series, 57).

regiões de ocorrência de geadas severas nos estados da região sul do país, sendo que as maiores áreas localizam-se no Município de Guarapuava, PR (KRATZ, 2011).

Segundo Lima (2007), o *Eucalyptus benthamii* tem se mostrado bastante resistente às geadas, suportando temperatura de - 6 °C na fase inicial, sem causar danos às plantas. Também se mostrou uma espécie muito promissora em termos de produtividades, sendo que os primeiros resultados foram bastante satisfatórios, apresentando na maioria dos casos, incremento médio anual (IMA) superior a 45 m<sup>3</sup>.

De acordo com alguns resultados levantados por Paludzyszyn Filho, Santos, Ferreira (2006), *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii* constituem um grupo muito restrito no que se refere às espécies de eucalipto que são de grande importância econômica para o Brasil, pois se pode cultivá-las em regiões que apresentam as condições mais frias do país, sendo que estas apresentam boa aptidão, principalmente quando se trata de produção de madeira para fins energéticos e sólidos madeiráveis.

Relata-se ainda que a produção do híbrido interespecífico entre os materiais citados poderá proporcionar benefícios extras, ao associar as vantagens adaptativas e silviculturais das espécies parentais registradas na literatura (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006). Por ser uma espécie de clima subtropical, Assis e Mafia (2007) sugerem que *Eucalyptus benthamii* apresenta-se como uma boa alternativa como componente de híbridos resistentes ao frio.

### 3.2 DOENÇAS DO EUCALIPTO EM FASE DE VIVEIRO

Após sua introdução no Brasil para uso comercial, o eucalipto manteve-se praticamente livre de doenças até o início de 1970 (TEIXEIRA *et al.*, 2004). Em virtude da alta demanda por mudas somada a uma grande variabilidade genética de *Eucalyptus* para plantio, em meados da década de 80, começou a ser utilizada a técnica de propagação clonal, visando a formação de talhões mais homogêneos, formados por genótipos superiores (PAZ, 2009).

Segundo Mafia *et al.*, (2003) as condições ambientais necessárias nas fases iniciais deste tipo de processo, como o enraizamento, são extremamente favoráveis ao desenvolvimento de fitopatógenos, principalmente os fungos, podendo citar como exemplo *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* e diferentes espécies de *Cylindrocladium* (ALFENAS *et al.*, 2009).

Os resultados de perdas na produção de mudas de *Eucalyptus* causadas pelo ataque de patógenos giram em torno de 1 % ao mês, mas quando ocorrem surtos epidêmicos, estas perdas podem chegar até 100 % do material propagativo (ALFENAS *et al.*, 2009).

O controle dos fitopatógenos em viveiro é realizado basicamente por meio de métodos químicos, que representam um elevado custo e impactos ambientais negativos. Ainda são empregados métodos culturais e genéticos, mas estes não têm apresentado uma taxa de controle eficiente, o que oportuniza a busca por agentes de biocontrole (GONÇALVES, 2003).

É possível a utilização de programas de controle biológico na área florestal, principalmente quando as mudas se encontram na fase de viveiro, onde as condições ambientais podem ser controladas (GRIGOLETTI JÚNIOR *et al.*, 2005).

Um viveiro de produção de mudas possui um ambiente bastante característico, com fatores ambientais controlados, como temperatura e umidade. Vale ressaltar que os valores ideais de alguns parâmetros para a produção de mudas também se aproximam dos níveis ótimos para o desenvolvimento de microrganismos fitopatogênicos. Por este motivo, plantas em fase de viveiro são alvos de diferentes patógenos (PAZ, 2009).

### 3.3 MOFO CINZENTO CAUSADO POR *Botrytis cinerea*

O *Botrytis cinerea* é um fungo necrotrófico polífago, associado como agente causal de doença a mais de 200 espécies de plantas cultivadas em todo o planeta (WILLIAMSON *et al.*, 2007). Provavelmente, é a doença mais comum e mais amplamente distribuída em culturas agrícolas, ornamentais e frutíferas pelo mundo (AGRIOS, 2005). No eucalipto, é o agente causal do mofo cinzento, uma das doenças de maior importância no sul do Brasil. Este

fungo é capaz de atacar a maioria das espécies e clones de *Eucalyptus* (ALFENAS *et al.*, 2009; KRUGNER e AUER, 2005).

Segundo Krugner e Auer (2005), esta doença ocorre principalmente nas regiões Sudeste e no Sul do Brasil, em viveiros e em casas de vegetação. Os ataques mais severos surgem em canteiros ou bancadas com alta densidade de mudas e sob condições de alta umidade e temperaturas amenas. A doença também já foi registrada em condições de campo na região Sul do país, com ocorrência em plantios jovens de *Eucalyptus dunnii* (Krugner e Auer, 2005).

### 3.3.1 Etiologia, Disseminação e Condições Favoráveis

*Botrytis cinerea* é um patógeno facultativo que vive saprofiticamente no solo e sobrevive na forma de escleródios ou micélio dormente. A sua disseminação se dá principalmente pelo transporte de conídios pelo vento e por insetos (KRUGNER e AUER, 2005; FURTADO *et al.*, 2000).

Alguns fatores como condições precárias de higiene e manejo no viveiro, temperaturas entre 15 e 25° C, dias curtos e nublados com alta umidade (acima de 90 %) e baixa luminosidade, são consideradas condições favoráveis para o desenvolvimento de *B. cinerea*. O patógeno penetra direta ou indiretamente nos tecidos do hospedeiro, não havendo necessidade de injúrias, no entanto, as epidemias são mais severas quando o material está fisiologicamente debilitado e/ou com ferimentos (ALFENAS *et al.*, 2009).

De acordo com Furtado *et al.*, (2000), uma vez que o patógeno esteja presente no interior da casa de vegetação, em épocas de inverno e sob alta umidade, este inicia o seu processo de colonização nas folhas mais inferiores da muda, que estão em contato com o substrato, fazendo com que adquiram um aspecto encharcado e uma coloração enegrecida. A partir deste momento, passam a se disseminar para as mudas da bandeja através das folhas basais, levando o patógeno desta fase para as fases subseqüentes, causando grandes perdas.

### 3.3.2 Sintomatologia

A doença ocorre em tecidos jovens da parte aérea das mudas, atingindo folhas e caule, causando a morte do ápice ou até mesmo de toda a muda, em virtude da localização das lesões e do estágio de crescimento em que a muda se encontra. Os sintomas iniciam-se por um enrolamento das folhas, seguido de seca e sua queda. Segundo Alfenas *et al.*, (2009), o mofo cinzento causa morte de mudas em reboleiras ou distribuídas aleatoriamente nos canteiros. Posteriormente, forma-se uma coloração cinza formada por conidióforos e massas de conídios do fungo sobre as partes afetadas (KRUGNER e AUER, 2005).

A doença também se manifesta nas fases de desenvolvimento e rustificação das mudas, criando um sintoma denominado de “canela-preta”, caracterizado pelo anelamento da haste na altura do terço inferior até a metade da muda, fazendo com que a haste atingida fique quebradiça, levando a grandes perdas de mudas no viveiro e no pós-plantio. Se as equipes de viveiro e campo não estiverem devidamente treinadas para reconhecer esta doença e descartar as mudas doentes, estas vão para campo e acabam morrendo, o que leva à necessidade de realizar o replantio (FURTADO *et al.*, 2000).

### 3.3.3 Controle

O controle é feito com manejo integrado no viveiro, por meio de medidas de higiene, de práticas culturais para eliminar fontes de inóculo e também reduzir as condições favoráveis para a infecção (ALFENAS *et al.*, 2009).

O controle deste patógeno também é realizado utilizando fungicidas sintéticos (CHEN *et al.*, 2008). No entanto, além do impacto ambiental dessa estratégia de controle, esta prática é considerada ilegal no cultivo de eucalipto no Brasil, pois não existe nenhum produto químico registrado para a mesma (ALFENAS *et al.*, 2009).

Diversos fungicidas foram recomendados para o controle do mofo cinzento em eucalipto: benomyl, tiofanato metílico, thiram e captan (FERREIRA, 1989); iprodione e mancozeb (REYNA e ROMERO, 2001); vinclozolin, epoxyconazole, triadimenol, tebuconazole, epoxyconazole +

pyraclostrobin, captan, thiram, iprodione (ALFENAS *et al.*, 2009); captan, dicloran ou chlorothalonil (FERREIRA e MILANI, 2002). Deve-se destacar que em muitas ocasiões, o uso contínuo de um mesmo fungicida pode selecionar uma população do patógeno resistente ao produto. A fim de evitar esta condição, recomenda-se o uso alternado de diferentes produtos (BROWN, 2000).

A periculosidade dos produtos químicos ao ambiente e ao homem tem estimulado a redução do controle químico e o aumento do uso de outras medidas como o controle cultural, o controle biológico, o genético e o controle com produtos alternativos (CAMPANHOLA e BETTIOL, 2003).

### 3.5 CONTROLE BIOLÓGICO

De acordo com Cook e Baker<sup>2</sup> (1983) citados por Schwan-Estrada, Stangalin e Cruz (2000), pode-se definir o controle biológico como o controle de um microrganismo através da ação direta de um outro microrganismo antagônico, que pode atuar por meio de antibiose, parasitismo, competição, predação ou hipovirulência.

Segundo Bettiol, Ghini e Morandi (2005), quando relacionados os microrganismos, ocorrem interações antagônicas envolvendo fungos leveduriformes e filamentosos e bactérias com os patógenos, devido ao parasitismo, à competição, à antibiose e à indução de resistência.

Atkinson e Mckinlay<sup>3</sup> (1995) citados por Paula Júnior *et al.* (2005), relatam que vários estudos de controle biológico descrevem uma abordagem semelhante, onde é destacado o encontro patógeno-antagonista ou presa-predador. Ao se tratar de situações semelhantes a estes estudos, após a introdução de um agente microbiano de controle biológico, haverá o seu estabelecimento em um nicho e posteriormente sua interação com o organismo alvo e outras espécies de organismos. Essas interações complexas são de

---

<sup>2</sup> COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens**. St. Paul: APS Press, 1983. 539p.

<sup>3</sup> ATKINSON, D.; MCKINLAY, R. G. Crop protection in sustainable farming systems. In: MCKINLAY, R. G.; ATKINSON, D. **Integrated crop protection: towards sustainability**. 1995. 488p.

grande importância para o sucesso do controle, devem ser analisadas de forma cuidadosa, compreendidas durante um longo período de tempo e com a necessidade de um amplo conhecimento da ecologia de sistemas (BIZI, 2006).

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*. Em outro estudo feito por Piccinin e Pascholati (1995) *Saccharomyces cerevisiae* reduziu de 40 a 100 % a ocorrência da doença em mudas de eucalipto.

Bizi (2006) testando microrganismos antatogistas contra oídio e mofo cinzento encontrou diferentes resultados. No caso do mofo cinzento, os microrganismos *Bacillus subtilis*, *T. viride*, *S. cerevisiae*, *Lecanicillium* sp. e *C. rosea* não apresentaram eficiência comparados com a testemunha. No caso do oídio, somente *Lecanicillium* sp. mostrou-se eficiente em relação aos outros microrganismos, diferindo da testemunha.

Nos últimos anos, tem havido uma crescente na utilização de produtos comerciais à base de agentes de controle biológico. Para muitos, o controle biológico de patógenos com antagonistas residentes parece conflitante com o uso de antagonistas introduzidos, no entanto, alguns autores comentam que as duas estratégias podem ser usadas de forma convergente (PAULA JÚNIOR *et al.*, 2005).

As maiores oportunidades para viabilizar o controle biológico encontram-se em situações que permitam e/ou assegurem o estabelecimento dos antagonistas (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2001). Tais condições acontecem nos casos de doenças causadas por patógenos que colonizam o substrato para a produção de mudas, quando a infecção se inicia pelas raízes das mudas e, quando há penetração pelos ferimentos naturais ou nas injúrias, eventualmente causadas pelo manejo das plantas. Condições que ocorrem em ambiente controlado onde é facilitada a instalação dos antagonistas no sitio alvo, também são consideradas favoráveis para o controle biológico (BIZI, 2006).

Desta forma, vale ressaltar que produção de plantas em viveiros oferece condições únicas ao controle biológico, em função do ambiente controlado das casas de vegetação, o alto valor de seus cultivos e o número limitado ou

inexistente de produtos registrados para o controle de doenças (PAULITZ e BÉLANGER, 2001).

### 3.4 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Segundo Araújo *et al.*, (2002), microrganismos endofíticos são aqueles que podem ser isolados do interior de tecidos vegetais desinfestados superficialmente, e que não causam nenhum dano ao seu hospedeiro. Colonizam um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos e, portanto, podem ser importantes para o controle destes. Os principais grupos são os fungos e as bactérias.

A definição de microrganismo endofítico é bastante variável, sendo que esta geralmente depende da forma de como os endófitos estão sendo isolados e conseqüentemente avaliados. O isolamento dos endofíticos pode ser feito de forma direta ou indireta, utilizando meios de cultura ou via técnicas moleculares, visando o isolamento dos microrganismos endofíticos, fatores que demonstram uma visão mais realista da comunidade endofítica do hospedeiro (LACAVA *et al.*, 2006).

Strobel *et al.*, (2004) relatam que apesar da ampla distribuição taxonômica de hospedeiros de endófitos, deve-se admitir que todas as plantas possuam uma ou mais espécies de endófitos em seu interior.

Alguns indicadores levam a crer que a relação endófito-planta ocorre há muito tempo, desde o surgimento das plantas superiores (KRINGS *et al.*, 2007). Ao longo do tempo, esta associação deve ter permitido transferências genéticas entre endófitos e hospedeiros e vice-versa, o que permite um mecanismo mais rápido e seguro do endófito minimizar os estresses ambientais, além de permitir maior compatibilidade com a planta hospedeira (PAZ, 2009). Por conta destas razões, determinados mecanismos bioquímicos foram selecionados e mantidos ao longo da evolução, que resultaram na produção de hormônios de crescimento vegetal (STROBEL, 2002).

Os microrganismos endofíticos penetram nas plantas basicamente através de aberturas naturais ou ferimentos, sendo que a principal porta de entrada é o sistema radicular (NETO *et al.*, 2002), com possibilidades de o



hospedeiro ainda produzir substâncias atrativas aos microrganismos, dentre elas os flavonóides (BROUGHTON *et al.*, 2000). Os mecanismos pelos quais os endófitos podem atuar como agentes de biocontrole incluem a produção de substâncias antifúngicas e antibacterianas (CASTILLO *et al.*, 2006).

Segundo Azevedo (1998), várias mudanças fisiológicas em plantas possuem relação com a presença de microrganismos endofíticos, sendo que equilíbrio entre hospedeiro e simbiote parece ser controlado por substâncias químicas (HUANG *et al.*, 2001).

Os microrganismos endofíticos apresentam grandes vantagens quando comparados a microrganismos epifíticos, em virtude de ocuparem um nicho praticamente vago, terem maior acesso aos nutrientes e proporcionarem uma proteção contra dessecação, doenças, pragas e parasitas (LEWIS *et al.*, 2001).

Por possuírem características intrínsecas na sua relação com as plantas, os microrganismos endofíticos são candidatos promissores a agente de controle biológico (BACKMAN; SIKORA, 2008). Em meio aos impactos causados pelos agrotóxicos, o método de controle biológico com microrganismos endofíticos tem despontado como uma alternativa ecologicamente correta para sanar tais eventos negativos provocados por agentes químicos (PAZ, 2009).

No Brasil, são escassos os trabalhos com microrganismos endofíticos como agentes de biocontrole de doenças do eucalipto. A maioria dos trabalhos atuais no país tem como objeto de estudo outras culturas e restringem-se à utilização de bactérias, como nos trabalhos realizados por Procopio (2004) e Paz (2009), que isolaram bactérias endofíticas de eucalipto para selecioná-las como agentes de biocontrole. Também existem trabalhos com produtos comerciais à base de endófitos, mas não compreendem o uso de fungos endofíticos.

Devido a todas essas propriedades apresentadas por estes microrganismos, abre-se um novo campo para estudos que realizem o isolamento e seleção de fungos endofíticos como agentes de biocontrole.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos de laboratório foram conduzidos no período de outubro de 2009 a abril de 2012, no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro) da Universidade Federal do Paraná e no Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, respectivamente localizados nas cidades de Curitiba e Colombo, PR.

Para a coleta de material vegetal, os trabalhos de viveiro e campo foram conduzidos na empresa Golden Tree, localizada na cidade de Guarapuava-PR.

### 4.1 OBTENÇÃO DE MATERIAL VEGETAL PARA OS ISOLAMENTOS

Foram utilizadas 30 mudas sadias de *Eucalyptus benthamii* com três meses de idade, procedentes de viveiro comercial formadas com sementes de APS, localizada no município de Guarapuava-PR.

As mudas foram produzidas em tubetes de 50 cm<sup>3</sup> preenchidos com substrato comercial a base de vermiculita e casca de pínus, seguindo os regimes de irrigação determinados pelo viveiro. As mudas tinham aproximadamente 30 cm de altura, sendo que o terço superior possuía as dimensões que compreendiam os três primeiros pares de folha. Na casa de vegetação, as mudas foram acondicionadas em bandejas e mantidas com irrigação manual apenas molhando-se o substrato quando necessário.

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* (FIGURA 1).

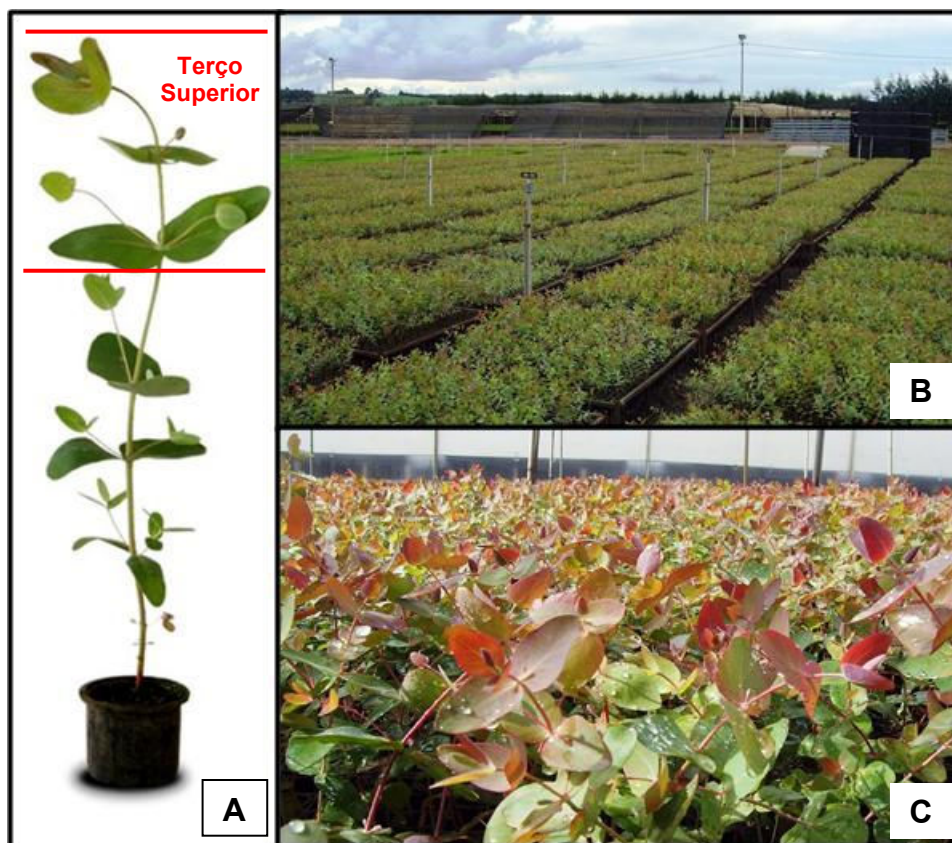


FIGURA 1 – A: MUDA DE *E. benthamii* COM TRÊS MESES DE IDADE E TERÇO SUPERIOR CONTENDO OS TRÊS PRIMEIROS PARES DE FOLHAS; B: INSTALAÇÕES DO VIVEIRO COMERCIAL PRODUTOR DAS MUDAS DE *E. benthamii* CEDIDAS PARA ESTUDO; C: LOTE DE MUDAS DE *E. benthamii* UTILIZADAS NO EXPERIMENTO.

FONTE: O autor (2011)

#### 4.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Ao se tratar de fungos endofíticos, é necessário realizar uma técnica de desinfecção superficial, que foi executada utilizando o protocolo descrito em Araújo *et al.* (2002) com adaptações:

- a) Corte do terço superior das mudas com estilete, contendo os três primeiros pares de folhas;
- b) Lavagem das amostras em água corrente para a retirada de resíduos de poeira e solo;
- c) Imersão em solução de álcool 70 % por 1 minuto;
- d) Imersão em solução de hipoclorito de sódio 1 % por 3 a 4 minutos;
- e) Imersão em solução de álcool 70 % por 30 segundos;
- f) Enxágue por duas vezes em água destilada e esterilizada.

Posteriormente à desinfecção das amostras, procedeu-se o corte destas em discos de folhas contendo a nervura central e de segmentos de hastes das partes mais jovens das mudas de *Eucalyptus benthamii*, cada amostra individual com cerca de 1 cm<sup>2</sup> de área.

Após este processo, três discos foliares e três segmentos de haste de cada muda foram colocados em placas de Petri contendo meio BDA (batata dextrose ágar comercial, 39 g; 1000 mL), com a face abaxial da folha em contato com o meio. No total, foram preparadas 100 placas, sendo 50 de discos de folhas e 50 de segmentos de hastes, totalizando em 300 fragmentos. As placas foram incubadas em câmara BOD a 25 °C, no escuro.

Com o surgimento das colônias, estas foram purificadas para posterior identificação. Parte dos isolados foi transferida individualmente para tubos de ensaio contendo meio BDA, cultivados por sete dias e recobertos com óleo mineral esterilizado, identificados e mantidos para preservação em refrigeração a 4 °C no laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas.

A frequência dos isolados foi obtida a partir da expressão:

$$(F\%) = (Ni / Nt) \times 100$$

Onde, F% é a frequência do isolado endofítico, Ni é o número de isolados do antagonista endofítico e Nt é o número total de isolados endofíticos.

#### 4.3 IDENTIFICAÇÃO MACROSCÓPICA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Primeiramente, as colônias fúngicas dos isolados que se apresentavam distintas umas das outras, de acordo com a morfologia macroscópica da colônia (coloração do verso e reverso da colônia, tamanho, bordos e aspecto) foram purificadas em meio BDA e posteriormente separadas em grupos denominados morfotipos.

Para a identificação dos morfotipos, foi utilizada a técnica do microcultivo (KERN e BLEVINS, 1999) em uma colônia de cada grupo morfológicamente semelhante. Esta, consistiu na utilização de placas de Petri esterilizadas,

contendo em seu interior uma lâmina e um pedaço de algodão. Um cubo de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> de meio BDA foi cortado e colocado sobre uma lâmina contida no interior da placa. O fungo foi repicado em todos os lados do cubo, o qual foi posteriormente coberto por uma lamínula esterilizada. O algodão no interior foi umedecido com água destilada esterilizada e a placa incubada em câmara BOD entre 7 e 14 dias, a 28 °C.

Posteriormente, 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 (400x) para a identificação dos fungos ao nível de gênero e, sua classificação, realizada através da utilização de literatura especializada (BARNETT e HUNTER, 1972; LARONE, 1993).

#### 4.5 OBTENÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DO INÓCULO DE *Botrytis cinerea*

O isolado de *Botrytis cinerea* utilizado nos experimentos foi obtido a partir de mudas de *Eucalyptus benthamii* doentes com três meses de idade, também procedentes do viveiro comercial de Guarapuava-PR. Após um período de três a quatro dias em câmara úmida, o patógeno foi isolado pelo método direto sob microscópio estereoscópio. Com o auxílio de um estilete, foram recolhidos micélio e conídios do patógeno, que foram transferidos para placas de Petri com meio BDA.

Dentre os isolados obtidos, o isolado BG02 foi selecionado e utilizado nos experimentos, por apresentar bom crescimento e esporulação *in vitro* nos testes preliminares (FIGURA 2). Foram preparados três isolados monospóricos retirando-se pequenas quantidades de conídios da placa contendo o isolado BG02 e depositando-se em um tubo de ensaio com água destilada esterilizada. O tubo foi colocado em agitador Vórtex por 30 segundos e depois a solução foi espalhada sobre meio BDA com auxílio de alça de Drigalski. Após 24 horas, o macroconídio já germinado foi retirado e transferido também para meio BDA, e mantido em câmara BOD a temperatura de 25 °C (ALFENAS *et al.*, 2009), até produzir conídios para a inoculação.

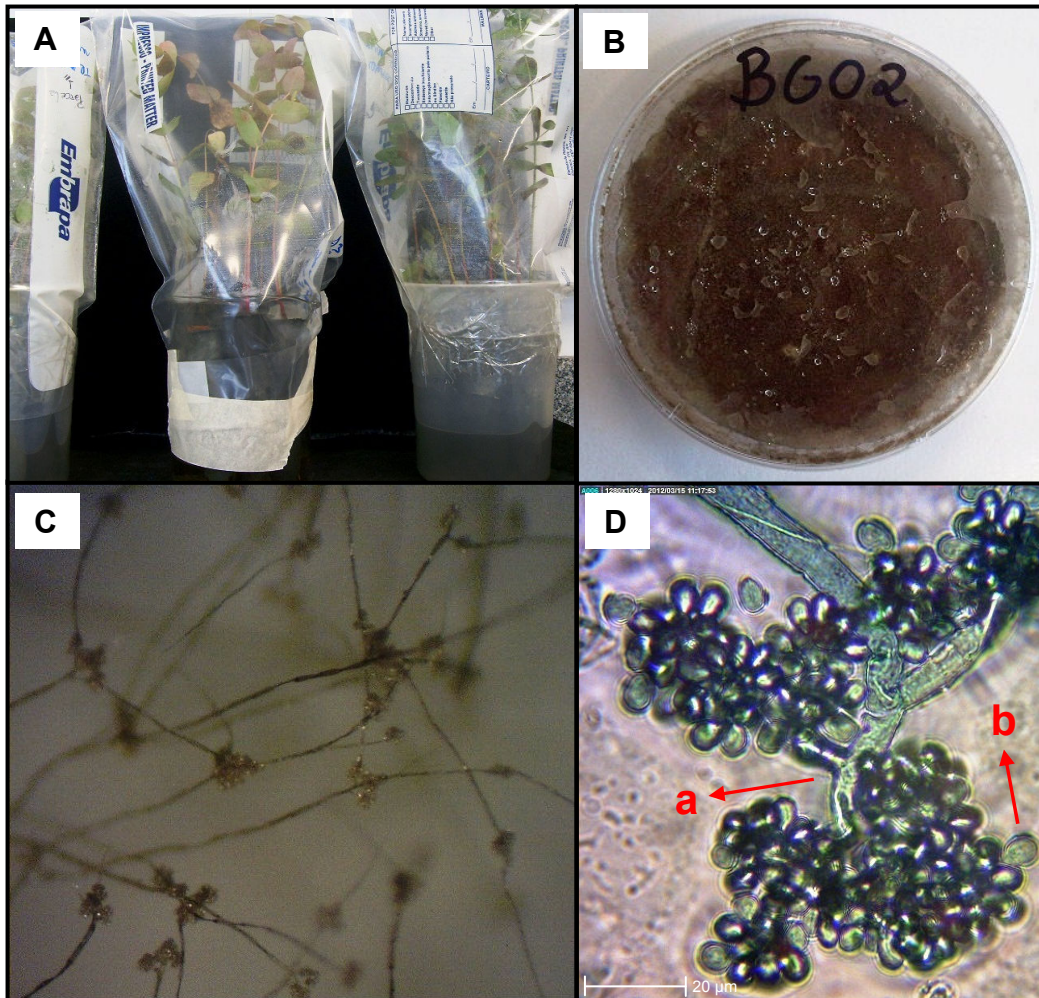


FIGURA 2 - ISOLADO BG02 DE *Botrytis cinerea*. A: CÂMARA ÚMIDA COM MUDAS DOENTES PARA ISOLAMENTO; B: CULTURA MONOSPÓRICA EM MEIO BDA; C: ESTRUTURAS REPRODUTIVAS DO FUNGO EM MICROSCÓPIO ESTEREOSCÓPIO A 20x; D: a) CONIDIÓFORO EM AUMENTO DE 400x E b) CONÍDIOS.  
 FONTE: O autor (2010)

Em função da alta demanda de inóculo do isolado de *Botrytis cinerea*, para que este sempre que utilizado nos testes estivesse em fase de crescimento ativo, foi desenvolvida uma técnica de multiplicação de *Botrytis cinerea* em frascos com brotações de *Eucalyptus benthamii*, de indivíduos com um ano de idade, provenientes de plantio experimental da Embrapa Florestas.

As brotações foram levadas ao laboratório e inseridas 100 gramas de brotações frescas em frascos de vidro com volume de 500 mL, dotados de tampa rosqueável com uma abertura de 1 cm de diâmetro para trocas gasosas. As brotações foram pulverizadas com 10 mL de água ultrapurificada para



manter o material vegetal úmido, e o frasco foi então fechado, vedado com papel filme de PVC e recoberto com papel alumínio. Em seguida, o frasco contendo as brotações foi esterilizado em autoclave a 121 °C sob pressão de 1 kg/cm<sup>2</sup>, durante 20 minutos.

Para a inoculação das brotações, preparou-se uma suspensão de esporos de *Botrytis cinerea* colocando-se 10 mL de água ultrapurificada numa placa de Petri com meio BDA contendo o isolado monospórico BG02 e raspando-se gentilmente a superfície para a liberação dos conídios. Esta suspensão foi aplicada sobre as brotações esterilizadas nos frascos. Os frascos foram submetidos à agitação manual por 30 segundos e incubados em câmara BOD a 25 °C, sob luz contínua, durante 4 dias para colonização e esporulação do patógeno. Após este período, os frascos foram retirados da câmara BOD e armazenados em prateleiras de estabilização também sob luz contínua (FIGURA 3).

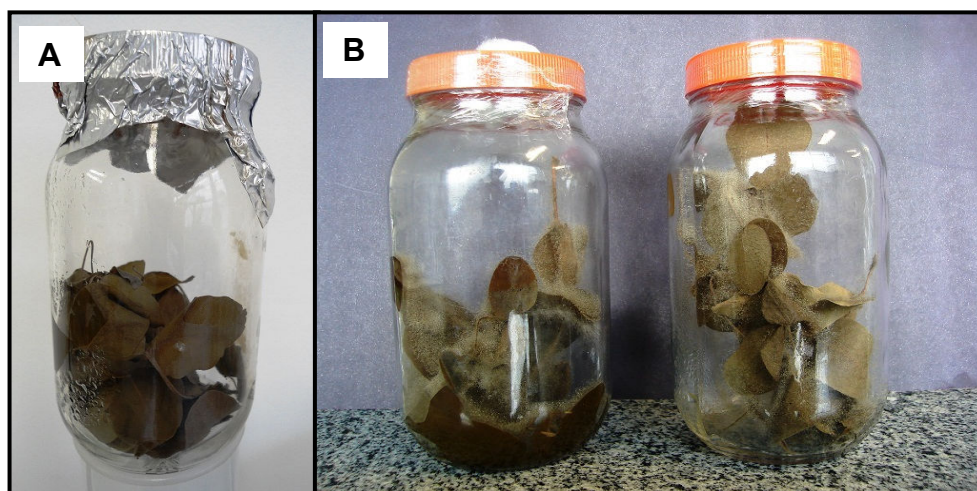


FIGURA 3 - PRODUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DO INÓCULO DO ISOLADO BG02 DE *Botrytis cinerea*: A: FRASCO CONTENDO BROTAÇÕES DE *Eucalyptus benthamii* LOGO APÓS A AUTOCLAVAGEM; B: FRASCOS CONTENDO BROTAÇÕES RECOBERTAS POR Densa ESPORULAÇÃO DO FUNGO.  
FONTE: O autor (2010)

#### 4.5.1 Determinação da Concentração de *Botrytis cinerea*

A suspensão de esporos para foi obtida por meio de lavagem dos frascos adicionando 100 mL de água destilada e mantendo sob agitação manual por 30 segundos.

Para determinar a concentração desejada da nova suspensão de esporos a ser utilizada nos testes subsequentes, o volume final da solução foi determinado através de teste preliminar de inoculação de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus benthamii* em 9 diferentes concentrações (1) 1,1; 3,0 e 5,4 x 10<sup>4</sup> conídios/mL; (2) 1,5; 3,1 e 4,8 x 10<sup>5</sup> conídios/mL e (3) 1,7; 3,1 e 5,1 x 10<sup>6</sup> conídios/mL. A concentração de 10<sup>6</sup> conídios/mL mostrou-se promissora, apresentando maior percentagem de severidade da doença, por isso a escolha de valores sempre na escala de concentração de 1 a 6 x10<sup>6</sup> conídios/mL.

Para a avaliação e determinação da concentração de esporos utilizou-se a câmara de Neubauer, sob microscópio ótico (400x).

#### 4.6 PAREAMENTO DE CULTURAS DE *Botrytis cinerea* COM FUNGOS ENDOFÍTICOS

Nesta etapa, foi utilizada a técnica de cultura pareada (MARIANO, 1993) para avaliação do antagonismo dos isolados endofíticos contra o fitopatógeno, respeitando o tempo de crescimento dos isolados e fitopatógeno avaliados.

Os discos contendo crescimento micelial dos isolados endofíticos e do patógeno *Botrytis cinerea* BG02, foram obtidos de colônias de crescimento ativo em meio BDA, previamente incubadas em câmara BOD, com temperatura de 25 °C, durante sete dias. Os discos foram retirados da borda das colônias com um coletor circular, com diâmetro inicial de 10 mm. Os discos do endófito e do patógeno foram posicionados, um em cada extremidade da placa de Petri contendo meio BDA e, novamente incubados em câmara BOD 25 °C, 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 que o micélio do patógeno atingiu o crescimento máximo na presença dos fungos antagônicos. 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 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:

$$(PI\%) = (Dc - Dt / Dc) \times 100$$

Onde, PI% é a porcentagem de inibição, Dc é o diâmetro médio da colônia do patógeno das placas do controle e Dt é o diâmetro médio da colônia do isolado endofítico nos tratamentos testados.

#### 4.7 TESTE DE PATOGENICIDADE COM FUNGOS ENDOFÍTICOS

Para este ensaio, apenas os fungos selecionados no teste de pareamento de cultura (F3, F6, F29) foram avaliados. Empregou-se metodologia adaptada dos estudos de patogenicidade em *Ilex* e *Eucalyptus* feitos por Lau e Grigoletti Junior (1997).

Foram utilizadas dez mudas saudáveis, vigorosas e uniformes em altura e número de folhas, por tratamento, que foram distribuídas em caixas plásticas (40 x 60 x 35 cm). Uma camada aproximada de 10 cm de vermiculita expandida de granulometria fina (entre 1 e 2 mm) umedecida, foi colocada no fundo das caixas para separá-las e mantê-las em posição vertical, para assim 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 (FIGURA 4).



FIGURA 4 - CAIXAS PLÁSTICAS UTILIZADAS PARA O TESTE DE PATOGENICIDADE E DE CONTROLE COM OS ENDÓFITOS.  
FONTE: O autor (2011)

A inoculação dos fungos endofíticos selecionados nos testes de antagonismo foi feita através de pulverização com uma suspensão de esporos obtida por meio da lavagem com água ultra-purificada de colônias cultivadas em placas de Petri com meio BDA, durante vinte dias, a 25 °C. Foram utilizados os isolados F3, F29 e F6. A concentração de esporos da suspensão do isolado F3 foi de  $5,5 \times 10^4$  conídios/mL,  $2,4 \times 10^4$  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 10 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.

#### 4.8 TESTE DE CONTROLE DE *Botrytis cinerea* COM FUNGOS ENDÓFITICOS

Neste teste foi utilizada a mesma base metodológica descrita no item 4.7, bem como o método de disposição das mudas em caixas plásticas.

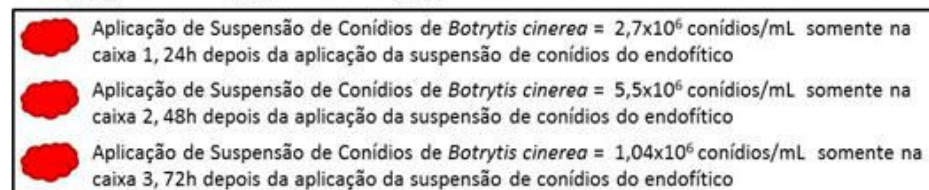
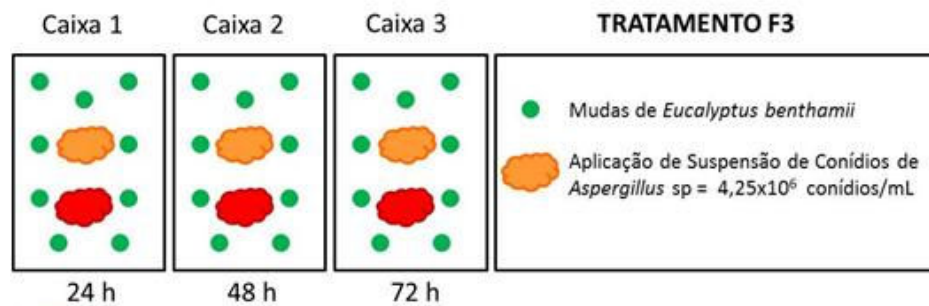
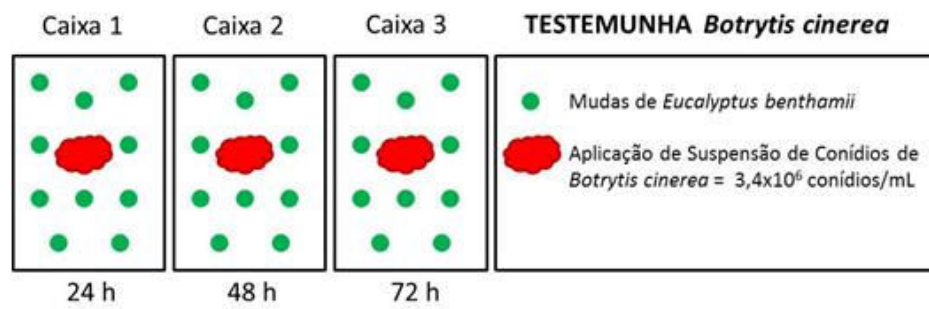
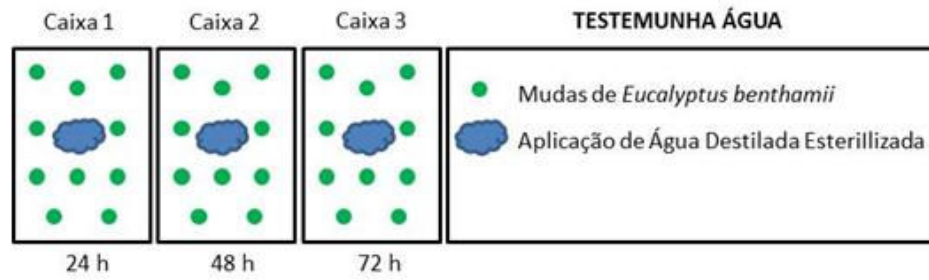
A suspensão de esporos dos fungos endofíticos foi obtida por meio da lavagem com água destilada esterilizada (ADE) de colônias cultivadas em

placas de Petri com meio BDA, durante vinte dias, com temperatura de 25 °C, em condições de laboratório. As suspensões de esporos do patógeno foram obtidas por meio de lavagem dos frascos contendo brotações colonizadas por *Botrytis cinerea* (item 4.5) com ADE.

A determinação da concentração de esporos de ambas as suspensões foram determinadas utilizando-se a câmara de Neubauer sob análise em microscópio ótico.

O ensaio foi delineado experimentalmente como fatorial 4 x 3, sendo três aplicações preventivas de suspensões de esporos e uma aplicação de fungicida, em três tempos de inoculação diferentes (24h, 48h e 72h), com dois tratamentos adicionais servindo como testemunhas:

- a) Testemunha água: Aplicação de 0,5 mL de ADE por muda;
- b) Testemunha *Botrytis cinerea*: Aplicação de suspensão de conídios do patógeno contendo  $3,4 \times 10^6$  conídios/mL;
- c) Endofítico F3: Aplicação de suspensão de conídios preparada com ADE e Tween 20 a 0,01%, ajustando-se a concentração em  $4,25 \times 10^6$  conídios/mL;
- d) Endofítico F29: Aplicação de suspensão de conídios preparada com ADE e Tween 20 a 0,01%, ajustando-se a concentração em  $3,45 \times 10^6$  conídios/mL;
- e) Endofítico F6: Aplicação de suspensão de conídios preparada com ADE e Tween 20 a 0,01%, ajustando-se a concentração em  $2,87 \times 10^6$  conídios/mL;
- f) Fungicida Iprodione: Aplicação do fungicida a uma dose de 2,4 mL para um litro de água, conforme descrito em Alfenas *et al.* (2009);



Continua

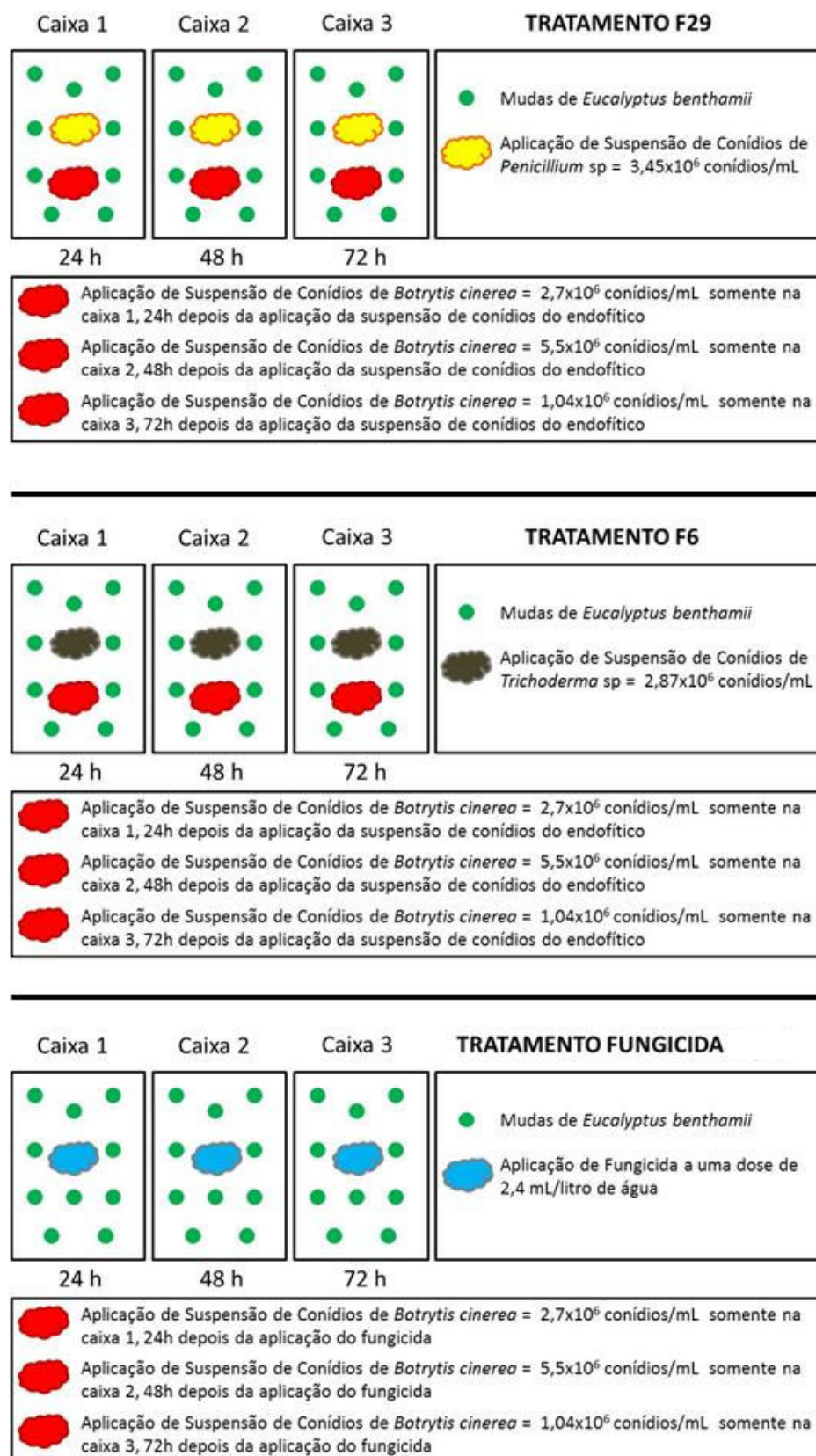


FIGURA 5 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA DISPOSIÇÃO DOS TRATAMENTOS TESTEMUNHA ÁGUA, TESTEMUNHA *Botrytis cinerea*, ISOLADOS ENDOFÍTICOS F3, F29, F6 E FUNGICIDA IPRODIONE.  
 FONTE: O autor (2011)

Decorridas 24, 48 e 72 horas da aplicação dos fungos endofíticos (Tabela 1), as mudas foram inoculadas com suspensão de conídios do patógeno *Botrytis cinerea* BG02 contendo  $2,7 \times 10^6$ ,  $5,5 \times 10^6$  e  $1,04 \times 10^6$  conídios/mL, respectivamente, somente nos tratamentos C, D, E e F, conforme Figura 5. A primeira suspensão de conídios do patógeno foi aplicada nas caixas de número 1, a segunda suspensão foi aplicada nas caixas de número 2 e a terceira, nas caixas de número 3. As caixas permaneceram sempre encobertas com tampas formando a câmara úmida, sendo apenas destampadas no momento das aplicações, e mantidas durante o período de incubação em casa de vegetação, sem controle de temperatura.

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS TRATAMENTOS COM OS ENDÓFITOS F3, F29, F6 E FUNGICIDA IPRODIONE CONTRA *Botrytis cinerea*, NOS DIFERENTES TEMPOS DE INOCULAÇÃO.

TRATAMENTO	CÓDIGO	TEMPO DE INOCULAÇÃO (H)
F3 <i>Aspergillus</i> sp.	T1	24h
	T2	48h
	T3	72h
F29 <i>Penicillium</i> sp.	T4	24h
	T5	48h
	T6	72h
F6 <i>Trichoderma</i> sp.	T7	24h
	T8	48h
	T9	72h
Fungicida Iprodione	T10	24h
	T11	48h
	T12	72h
ÁGUA	Testemunha Água	Momento zero
<i>Botrytis cinerea</i>	Testemunha Patógeno	Momento zero

FONTE: O autor (2013)

Foram realizadas três avaliações, a primeira aos sete dias, a segunda aos quatorze dias, e a última no final do período, aos 21 dias de incubação. O

método de avaliação foi baseado em uma escala de notas para avaliação da severidade do mofo cinzento em *E. dunnii* (BIZI, 2006) e adaptado neste ensaio para o *Eucalyptus benthamii*:

0 → Ausência de sintomas

1 → Infecção leve (lesão restrita ao ferimento, sem coalescência)

2 → Infecção média (lesões coalescentes na folha, sem atingir o caule)

3 → Infecção severa (lesões coalescentes na folha, até atingir o caule)

4 → Infecção muito severa (evolução da doença até a ponteira da muda)

A percentagem de controle da doença foi obtida por meio da fórmula descrita por Bizi (2006):

$$\text{Controle (\%)} = (\text{Sev. Test.} - \text{Sev. Trat.} / \text{Sev. Test.}) \times 100$$

Onde, Sev. Test. representa a severidade da testemunha e Sev. Trat a severidade do tratamento.

Este ensaio considerou 10 repetições (mudas) por tratamento, sendo que as testemunhas utilizaram 30 repetições (mudas). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo programa Assistat 7.6 (SILVA; AZEVEDO, 2009) e foi feita a análise da variância seguida da comparação das médias pelo teste de Duncan, a 5 % de probabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

A partir do isolamento, foram obtidos 62 fungos endofíticos (TABELA 2), e identificados 9 gêneros (FIGURA 6): *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 fungo *Helminthosporium* sp. foi o único identificado nos dois tipos de amostras.

TABELA 2 - IDENTIFICAÇÃO E FREQUÊNCIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FOLHAS E HASTES DE MUDAS DE *Eucalyptus benthamii*. Guarapuava-PR, 2009.

CÓDIGO	ISOLADO	NÚMERO DE ISOLADOS	FREQUÊNCIA (%)	ORIGEM
F-13	<i>Alternaria</i> sp.	16	25,83	Disco Foliar
F-30	<i>Amblyosporium</i> sp.	1	1,61	Disco Foliar
F-3	<i>Aspergillus</i> sp.	2	3,22	Disco Foliar
H-9	<i>Helminthosporium</i> sp.	35	56,45	Disco Foliar/Haste
F-29	<i>Penicillium</i> sp.	4	6,45	Disco Foliar
H-18	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1	1,61	Haste
H-22	<i>Phoma</i> sp.	1	1,61	Haste
F-14	<i>Rhizoctonia</i> sp.	1	1,61	Disco Foliar
F-6	<i>Trichoderma</i> sp.	1	1,61	Disco Foliar

FONTE: O autor (2012).

Pérez-Vera *et al.* (2005) isolaram fungos endofíticos pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis* e *Trichoderma* em cultura pura, a partir de caules e ramos saudáveis de *Eucalyptus grandis*. Destes, o presente estudo encontrou cinco dos gêneros mencionados por Pérez-Vera *et al.* (2005).



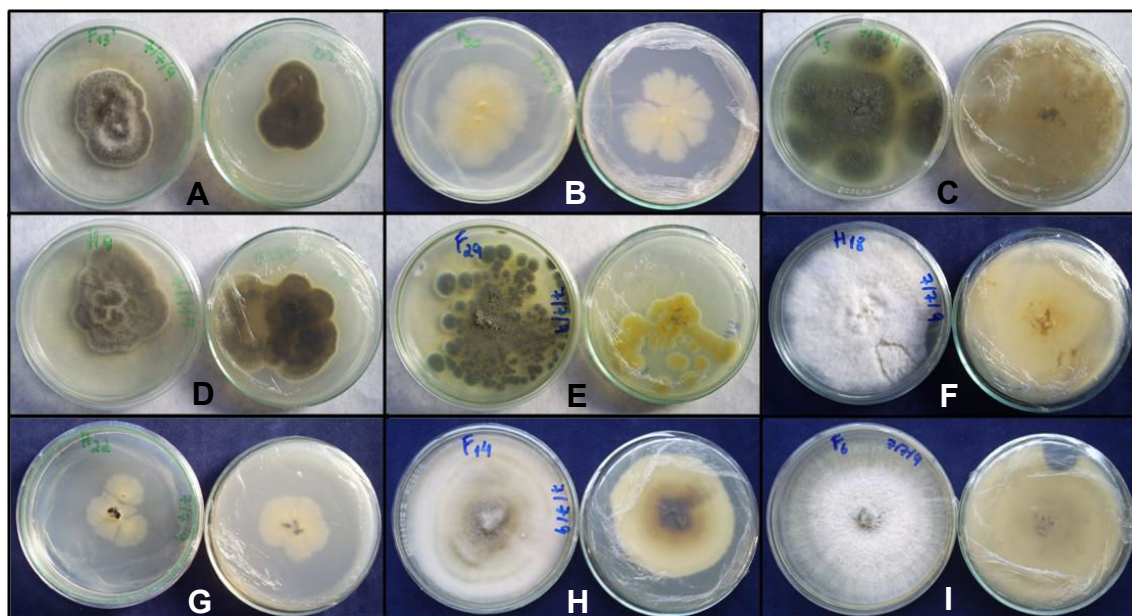


FIGURA 6 - MACROMORFOLOGIA DA COLÔNIA (VERSO E REVERSO) DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS CULTIVADAS EM MEIO BDA A 28 °C, POR 14 DIAS: A: *Alternaria* sp. – isolado F13; B: *Amblyosporium* sp. - isolado F30; C: *Aspergillus* sp. - isolado F3; D: *Helminthosporium* sp. - isolado H9; E: *Penicillium* sp. - isolado F29; F: *Pestalotiopsis* sp. - isolado H18; G: *Phoma* sp. - isolado H22; H: *Rhizoctonia* sp. - isolado F14; I: *Trichoderma* sp. - isolado F6  
 FONTE: O autor (2009)

Mercader *et al.* (2006) isolaram os gêneros de fungos endofíticos *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Penicillium* e *Cladosporium* como potenciais antagonistas, também a partir de caules e folhas de *Eucalyptus globulus*. O uso de caule e folhas serve para aumentar a probabilidade de obtenção de isolados compatíveis com o hospedeiro, e assim aumentar a possibilidade de sucesso em testes de controle biológico de *Botrytis cinerea*.

A maioria dos isolados endofíticos no presente estudo foi obtida de discos de folhas (35) e o restante dos segmentos de hastes (27).

Bettucci e Saravay (1993) isolaram *Aspergillus niger* van Tieghem, *Penicillium dendriticum* Pitt, *Penicillium* sp, *Phoma* sp, *Pestalotiopsis guepini* (Desm.) Stey., *Phoma lingam* Tode: Schw, *Trichoderma hamatum* (Bon.) Bain, *Trichoderma longibrachiatum* Rifai, *Trichoderma koningii* Oud, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., num total de 41 fungos endofíticos provenientes de caule e folhas de brotações de mudas de *Eucalyptus globulus*. Entretanto, estes autores não fizeram estudos de controle biológico.

## 5.2 PAREAMENTO DE CULTURAS DE *Botrytis cinerea* COM FUNGOS ENDOFÍTICOS

O pareamento do patógeno com os nove endófitos identificados, resultou em três valores de inibição positivos (*Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp.), representando a sobreposição dos fungos endofíticos ou a colonização de toda a superfície do meio de cultura, reduzindo o tamanho da colônia de *Botrytis cinerea*. Dois valores aproximados de zero (*Alternaria* sp. e *Pestalotiopsis* sp.), representando que os fungos endofíticos e patógeno colonizaram mais que 1/3 e menos que 2/3 da superfície do meio de cultura, com leve vantagem para os fungos endofíticos. Um valor igual a zero, representando a testemunha pela sobreposição em limites iguais para um dos endofíticos e o patógeno. Também se verificou quatro valores negativos, representando a sobreposição do patógeno que colonizou toda a superfície do meio, ou seja, os valores negativos além de não serem eficazes como inibidores do patógeno, podem ter produzido alguma substância que estimulou o crescimento de *Botrytis cinerea* (TABELA 3).

TABELA 3 - DIÂMETRO MÉDIO DAS COLÔNIAS (mm) E INIBIÇÃO (%) DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Botrytis cinerea*, APÓS TESTE DE PAREAMENTO EM MEIO BDA COM OS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FOLHAS E HASTES DE *Eucalyptus benthamii*.

ISOLADO	DIÂMETRO MÉDIO (mm)	INIBIÇÃO (%)*
<i>Trichoderma</i> sp.	26,2 a	16,50
<i>Penicillium</i> sp.	26,6 ab	6,36
<i>Aspergillus</i> sp.	30,0 b	4,45
<i>Alternaria</i> sp.	32,4 c	0,89
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	37,6 c	0,89
Testemunha	31,4 c	0,00
<i>Rhizoctonia</i> sp.	42,0 c	- 33,70
<i>Helminthosporium</i> sp.	43,4 c	- 38,20
<i>Amblyosporium</i> sp.	51,0 c	- 62,40
<i>Phoma</i> sp.	54,2 c	- 72,60

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%.

FONTE: O autor (2012)

Os testes realizados através do método de pareamento, revelaram o potencial antagonista de alguns fungos endofíticos contra *Botrytis cinerea*. Verificou-se a inibição do crescimento do patógeno e a sobreposição do micélio de *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. sobre *Botrytis cinerea* (FIGURA 7). Com 51 isolados provenientes do filoplano de mudas de *Eucalyptus grandis*, Sanfuentes e Ferreira (1996) utilizaram testes de supressão do patógeno em discos de folhas para pré-selecionar potenciais agentes de biocontrole de *B. cinerea* em mudas de eucalipto.

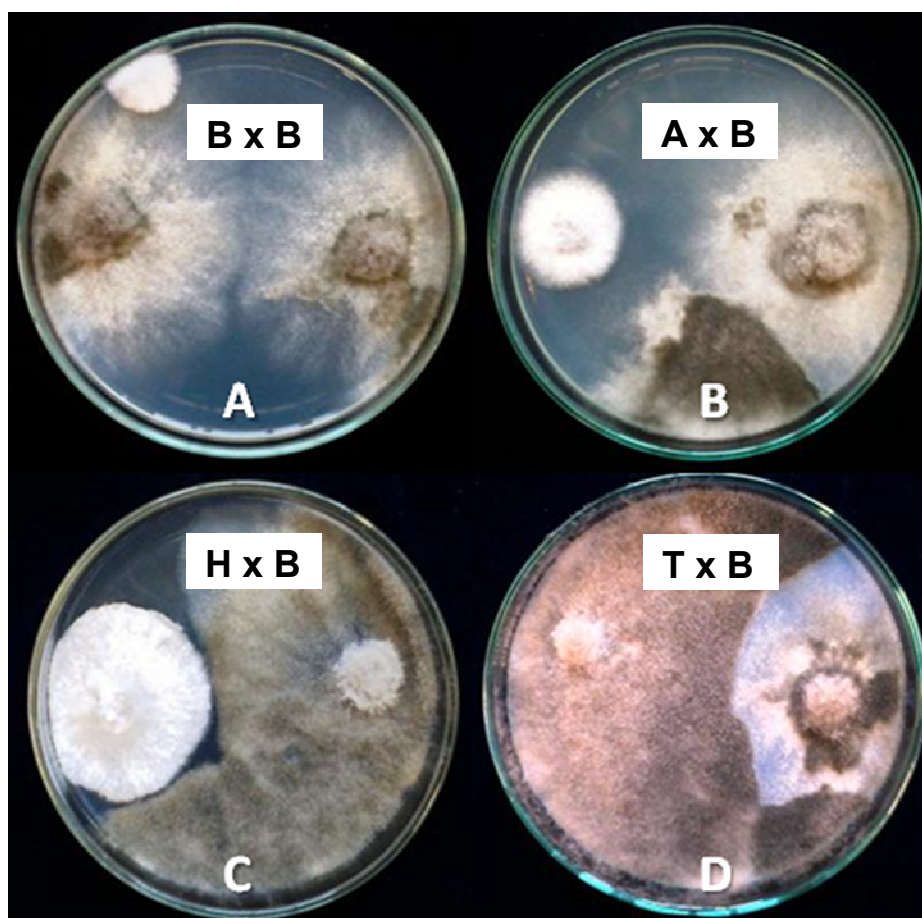


FIGURA 7 - TESTE DE ANTAGONISMO POR MEIO DO PAREAMENTO DE CULTURAS: A: *Botrytis cinerea* x *Botrytis cinerea* (testemunha); B: *Aspergillus* sp. x *Botrytis cinerea*; C: *Helminthosporium* sp. x *Botrytis cinerea*; D: *Trichoderma* sp. x *Botrytis cinerea*  
FONTE: O autor (2010)

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 *Botrytis cinerea* em mudas de eucalipto em condições de viveiro. O melhor resultado foi obtido no tratamento com *Gliocladium roseum*, não apresentando diferença significativa entre as diferentes espécies e isolados de *Trichoderma*.

Em ensaios de biocontrole *in vitro*, Mercader *et al.* (2006) testaram 71 isolados de fungos antagonistas em discos foliares de *Eucalyptus globulus* e dentre estes, *Trichoderma* sp., *Clonostachys* sp., *Penicillium* sp. e *Cladosporium* sp. reduziram significativamente a colonização e esporulação de *Botrytis cinerea*. A aplicação do método de seleção de antagonistas *in vitro* tem proporcionado indicadores confiáveis sobre a supressão de deste fungo em condições de campo (PENG e SUTTON, 1991).

A obtenção de bons resultados da atividade antagônica *in vitro* não corresponde à garantia da redução de doenças no campo (BETTIOL, 1991). No entanto, Kupper *et al.* (2003) relatam 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.

A partir dos testes preliminares de antagonismo através do método de pareamento de culturas, pode-se evidenciar o potencial de controle de alguns gêneros de fungos endofíticos, credenciando estes para a próxima etapa, que englobou os testes *in vivo* e sua comparação com um fungicida.

### 5.3 TESTE DE PATOGENICIDADE COM FUNGOS ENDOFÍTICOS

O teste avaliou os fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp. (F3, F29 e F6, respectivamente) constatando-se a ausência de lesões foliares nas mudas, demonstrando que estes isolados não foram patogênicos em *Eucalyptus benthamii*.

A relação endófito-planta pode ser danosa para a planta, quando os microrganismos endofíticos desencadeiam sintomas de doença, principalmente em condições de estresse do hospedeiro (MAES *et al.*, 2009), ou ainda

trazerem certas desvantagens para o hospedeiro, como a redução da sua capacidade fotossintética (PINTO *et al.* 2000).

Em um trabalho realizado por Vechiato (2010) no Laboratório de Patologia de Sementes do Instituto Biológico de São Paulo, foram encontrados os gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. associados às sementes de eucalipto. Estes fungos podem causar podridão e deterioração das sementes quando estas apresentam teor de umidade acima de 20 %. Algumas espécies de *Aspergillus* sp. são caracterizadas como indicadoras da deterioração das sementes, pois podem causar danos, descoloração e alterações nutricionais. Geralmente, este fungo cresce com menor teor de água e após a contaminação por *Penicillium* sp. Não existem relatos de testes de patogenicidade com estes fungos em mudas de eucalipto.

Segundo Azevedo (1998), é difícil estabelecer um limite definido entre microrganismos endofíticos e patógenos, sendo que algumas vezes certos endofíticos que não causam sintomas aparentes em determinado hospedeiro, podem agir como patógenos em outros. A partir disto, os testes de patogenicidade visam evidenciar quais seriam os efeitos na muda após a inoculação dos fungos endofíticos selecionados nos testes de antagonismo. Neste ensaio, os endófitos não foram fitopatogênicos.

#### 5.4 TESTE DE CONTROLE DE *Botrytis cinerea* COM FUNGOS ENDOFÍTICOS

Verificou-se que todos os tratamentos testados apresentaram valores de severidade significativamente inferiores ao da testemunha. O melhor fungo endofítico foi *Trichoderma* sp. (F6), do tratamento T7, com aplicação da suspensão de esporos 24 horas antes da inoculação do patógeno, que apresentou o segundo menor valor médio de severidade (0,4), representando o controle de 83,33 % da doença. As aplicações realizadas 48 e 72 horas antes da inoculação do *Botrytis cinerea* controlaram o mofo cinzento aos níveis de 79,17 % e 75 %.

O fungo *Aspergillus* sp. foi o segundo endofítico melhor colocado, no tratamento T1 - 24 horas, com 75 % de controle sobre a doença. O tratamento T2, com valor médio de severidade de 0,7, controlou 70,83 % da doença.

O fungo *Penicillium* sp. apresentou os menores valores de controle, com cerca de 54,17 % no tratamento T4 - 24 horas. Apesar das diferenças estatísticas não serem expressivas entre os dois primeiros fungos, pode-se observar que os fungos endofíticos reduziram o progresso da doença ao longo do tempo (TABELA 4).

TABELA 4 - SEVERIDADE MÉDIA E CONTROLE (%) DE MOFO CINZENTO EM MUDAS DE *Eucalyptus benthamii*, TRATADAS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS E IPRODIONE, EM TRÊS TEMPOS DE INOCULAÇÃO DO PATÓGENO *Botrytis cinerea*, APÓS 21 DIAS DE INCUBAÇÃO.

CÓDIGO	TRATAMENTO / TEMPO DE INOCULAÇÃO	SEVERIDADE MÉDIA	CONTROLE (%)
T11	Iprodione / 48h	0,1 a	95,83
T7	<i>Trichoderma</i> sp. / 24h	0,4 ab	83,33
T12	Iprodione / 72h	0,5 ab	79,17
T8	<i>Trichoderma</i> sp. / 48h	0,5 ab	79,17
T1	<i>Aspergillus</i> sp. / 24h	0,6 ab	75,00
T9	<i>Trichoderma</i> sp. / 72h	0,6 ab	75,00
T10	Iprodione / 24h	0,6 ab	75,00
T2	<i>Aspergillus</i> sp. / 48h	0,7 ab	70,83
T4	<i>Penicillium</i> sp. / 24h	1,1 abc	54,17
T6	<i>Penicillium</i> sp. / 72h	1,1 abc	54,17
Testemunha	Somente água	1,2 bc	47,50
T3	<i>Aspergillus</i> sp. / 72h	1,4 bc	41,66
T5	<i>Penicillium</i> sp. / 48h	1,9 cd	20,83
Testemunha	Somente <i>Botrytis cinerea</i>	2,4 d	-

Severidade da doença avaliada pela escala de notas de 0 a 4, onde 0 = ausência de sintomas; 1 = infecção leve; 2 = infecção média; 3 = infecção severa; 4 = infecção muito severa. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de significância. Os valores mais próximos de zero correspondem a uma maior eficiência de controle do patógeno. CV = 11,9%.

FONTE: O autor (2012)

Em ensaios realizados com aplicação de *Clonostachys* e *Trichoderma* para a supressão de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus globulus* em viveiro, Mercader *et al.* (2006) conseguiram resultados significativos, com redução da incidência do patógeno em valores maiores ou iguais a 85 %, confirmando a presença destes fungos na superfície das folhas da planta. Esses fungos foram capazes de permanecer no local por um tempo determinado e competir com outros microrganismos habitantes do filoplano, atributo importante para antagonistas eficazes no controle de *Botrytis cinerea*.

O tratamento T11, com aplicação de fungicida iprodione 48 horas antes da inoculação do patógeno, apresentou o menor valor médio de severidade (0,1), controlando 95,83 % do mofo cinzento.

Bizi (2006) testando os fungicidas iprodione e tiofanato metílico no controle de mofo cinzento em mudas de *Eucalyptus dunnii*, encontrou valores de severidade 0,60 e 0,48, representando o controle de 71,56 % e 77,25 % do mofo cinzento, respectivamente.

No final da década de 70, os fungicidas do grupo das dicarboximidas foram intensivamente aplicados no controle de *Botrytis cinerea*, dentre eles estavam o iprodione, vinclozolin e procymidone (LORENZ, 1994). Testes *in vitro* demonstraram baixo nível de resistência de vários isolados de *Botrytis cinerea* a iprodione e difenoconazole (CALDARI JÚNIOR, 1998). Por este histórico de frequentes aplicações e por sua eficácia perante o mofo cinzento, o fungicida de contato iprodione foi escolhido para os testes de controle.

As condições na câmara úmida (umidade próxima à saturação) podem favorecer tanto patógeno quanto antagonista (BIZI, 2006), porém nas situações que patógeno superou o endofítico, acredita-se que o progresso da doença pode ter sido favorecido pelo estresse que a muda sentiu neste ambiente. Apesar disto, o efeito dos antagonistas no controle de *Botrytis cinerea* pode ser de forma direta, crescendo sobre ele e inibindo sua atividade patogênica, mesmo após a formação de estruturas reprodutivas e de proteção, além de poder estimular respostas da resistência das plantas (ELAD *et al.*, 1998).

Quanto ao biocontrole, Melo (1996) relatou que as principais limitações ao uso de *Trichoderma*, *Gliocladium* e outros fungos antagonistas são a: falta de correlação entre os testes *in vitro*, a ineficiência na seleção de linhagens

efetivas e ensaios em condições de campo com grande quantidade de preparações necessárias para aplicação em larga escala.

Com base nos ensaios realizados, existe a perspectiva de que se aumentando a quantidade do antagonista em relação à população natural do organismo patogênico, combinado com uma maior frequência de aplicações no seu tempo ideal, seja possível aumentar as chances de sucesso de biocontrole.



## 6 CONCLUSÕES

1 – Foram isolados 62 fungos endofíticos provenientes de mudas de *Eucalyptus benthamii*, sendo 35 obtidos de discos de folhas e 27 de segmentos de hastes.

2 – Dos fungos endofíticos isolados foram identificados 9 gêneros: *Alternaria* sp., *Amblyosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Trichoderma* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phoma* sp. e *Helminthosporium* sp.

3 – Os testes *in vitro* entre *Botrytis cinerea* e os fungos endofíticos revelaram o potencial antagonista de *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

4 – Nos testes *in vivo* o fungo *Trichoderma* sp. apresentou melhor potencial de controle dentre os fungos testados.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes de controle do mofo cinzento em mudas de *Eucalyptus benthamii* mostraram que o fungicida é a melhor alternativa para o controle. Contudo, o controle biológico baseado na aplicação de uma suspensão de esporos do endófito *Trichoderma* sp. apresentou valores aproximados, em termos de eficiência, ao produto químico. Esse resultado indica que o controle biológico pode ser aperfeiçoado a partir de novos testes como a otimização em relação a concentração de esporos e a frequência de aplicações. Uma vez definido o método de controle, seu uso poderia ser inserido dentro das técnicas de manejo integrado do mofo-cinzento em viveiros de mudas de eucalipto.

## REFERÊNCIAS

- ABRAF. **Anuário estatístico da ABRAF 2012, ano base 2011/ ABRAF**. Brasília, 2012. 150 p.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. Ed. Amsedam: Elsevier. 2005. 922p.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2º Edição. Viçosa, MG. Editora UFV. 2009. 500 p.
- ARAUJO, W.L.; LACAVAL, P.T.; ANDREOTE, F. D. & AZEVEDO, J.L. **Interactions between endophytes and plant host: biotechnological aspects**. In: AIT BARKA, E.; CLÉMENT, C. *Plant-Microbe Interactions*. Research Signpost: Kerala, 2008. p. 95-115.
- ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKINSKY-SOBRAL, J.; LACAVAL, PT. **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2002. 86p.
- ASSIS, T. F. de; MAFIA, R. G. **Hibridação e clonagem**. In: BORÉM, A. (Ed.). *Biotecnologia florestal*. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 93-121.
- 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. **Microorganismos endofíticos**. In: MELLO, I. S. and AZEVEDO, J. L. (Ed.). *Ecologia microbiana*. São Paulo: Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, p. 117 – 137, 1998.
- BACKMAN, P. A.; SIKORA, R. A. **Endophytes: an emerging tool for biological control**. *Biological Control*, Montreal, v. 46, p. 1-3, 2008.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3.ed. New York: MacMillan, 1972. 241p.

BETTIOL, W. **Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos.** In: Bettiol, W. org. Controle Biológico de Doenças de Plantas. Embrapa - CNPDA. Jaguariúna, p. 223 – 236, 1991.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MORANDI, M. A. B. **Alguns métodos alternativos para o controle de doenças de plantas disponíveis no Brasil.** In: VENEZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; PALLINI, A. (Eds.). Controle Alternativo de Pragas e Doenças. Viçosa: EPAMIG/CTZM, p. 163-183, 2005.

BETTUCCI, L.; SARAVAY M. **Endophytic fungi of *Eucalyptus globulus*: a preliminary study.** - Mycol. Res. 97: 679-682, 1993.

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 JUNIOR, A.; AUER, C. G. **Seleção de fungicidas para controle de oídio em eucalipto.** Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo, n. 51, p 165-170, 2005.

BROUGHTON, W. J.; JABBOURI, S. & PERRET, X. **Keys to symbiotic harmony.** Journal of Bacteriology, Washington, v. 182, n. 20, p. 5641-5652, 2000.

BROWN, B.N. **Management of disease during eucalypt propagation.** In: KEANE, P. J.; KILE, G. A.; PODGER, F. D.; BROWN, B. N. Eds. Diseases and pathogens of Eucalypts. Collingwood: CSIRO Publish., p. 487-.517. 2000.

BUTCHER, P. A.; SKINNER, A. K.; GARDINER, C. A. **Increased inbreeding and inter-species gene flow in remnant populations of the rare *Eucalyptus benthamii*.** Conservation Genetics, v. 6, n. 2, p. 213-226, 2005.

CALDARI JÚNIOR, P. **Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores e plantas ornamentais.** 1998. 51 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p. 279. 2003.

CASTILLO, U.F.; STROBEL, G.A.; MULLEMBERG, K.; CONDRON, M.M.; TEPLow, D.B.; FOLGIANO, V.; GALLO, M.; FERRACANE, R.; MANNINA, L.; VIEL, S.; CODDE, M.; ROBISON, R.; PORTER, H. & JENSES, J. **Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL3052**. FEMS Microbiology Letters, Reading, v. 255, p. 296-300, 2006.

CHEN, H.; XIAO, X.; WANG, J.; WU, L.; ZHENG, Z.; YU, Z. **Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea***. Biotechnology Letters, Hull, v. 30, n. 5, p. 919-923, 2008.

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.

ELAD, Y.; KIRSHNER, B.; YEHUDA, N.; SZTEJBERG, A. **Management of powdery mildew and gray mold of cucumber by *Trichoderma harzianum* T 39 and *Ampelomyces quisqualis***. BioControl 43: 241 - 245, 1998.

FERREIRA, F. A. **Patologia Florestal**. Principais doenças florestais no Brasil. Viçosa, Sociedade de Investigações Florestais, 570p.1989.

FERREIRA, F. A.; MILANI, D. **Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil**. Mogi-Guaçu, International Paper, 98p. 2002.

FURTADO, E. L.; SANTOS, C. A. G. dos; TAKAHASHI, S. S.; CAMARGO, F. R. A. de. **Doenças em viveiros de *Eucalyptus* sp: Diagnóstico e Manejo**. Votorantim / Celulose e Papel. Botucatu, SP, p. 23, 2000.

GONÇALVES, R. C. **Etiologia da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil**. 2003, 79 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

GRIGOLETTI JUNIOR, A. G.; BIZI, R. M & AUER, C. G. **Metodologia para Inoculação Padronizada de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus dunnii***. Comunicado Técnico 134, Embrapa Florestas, 2 p, 2005.

HIGA, R. C. V. e PEREIRA, J. C. D. **Usos potenciais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage.** Comunicado Técnico no. 100 Embrapa Florestas, Colombo, 4p., 2003.

HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z. & SU, W. **Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*.** FEMS Immunology and Medical Microbiology, Reading, v. 31, p. 163-167, 2001.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia médica – Texto e Atlas.** 2 ed, São Paulo: Editoral Premier, 1999

KRATZ, D. **Substratos renováveis para produção de mudas de *Eucalyptus benthami* Maiden et Cambage e *Mimosa scabrella* Benth.** 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

KRINGS, M; TAYLOR, TN; HASS, H; KERP, H; DOTZLER, N; HERMSEN, EJ. **Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses.** New Phytologist, Lancaster, v. 174, n. 3, p. 648-657, 2007.

KRUGNER, T. L.; AUER, C. G. **Doenças dos eucaliptos.** In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 319-332.

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.

LACAVA, P.T.; ANDREOTE, F.D.; ARAUJO, W.L. & AZEVEDO, J.L. **Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR e DGGE.** Pesquisa Agropecuária. Brasileira, Brasília, v. 41, n. 4, p. 637-642, 2006.

LARONE, D. H. **Medically important fungi; a guide to identification.** Washington: American Society for Microbiology, 1993. 230p.

LAU, D.; GRIGOLETTI JUNIOR A. **Patogenicidade de *Cylindrocladium spathulatum* em espécies de *Ilex* e *Eucalyptus***. Fitopatologia Brasileira, Brasília. v. 22., Supl., p. 274, 1997.

LEWIS, L. C.; BRUCK, D.J.; GUNNARSON, R.D. & BIDNE, K.G. **Assessment of plant pathogenicity of endophytic *Beauveria bassiana* in Bt transgenic and non-transgenic corn**. Crop Science, Madison, v. 41, p. 1395-1400, 2001.

LIMA, E. A. *Eucalyptus benthamii* – **Uma alternativa energética para áreas de ocorrência de geadas severas**. Painel Florestal. 2007. Disponível em: <[http://painelflorestal.com.br/exibeNews.php?id=410&cod\\_editoria=4&url\\_back=news.php&pag=0&busca=](http://painelflorestal.com.br/exibeNews.php?id=410&cod_editoria=4&url_back=news.php&pag=0&busca=)> Acesso em: 20/07/2011.

LISBOA, B. B.; BOCHESSE, C. C.; VARGAS, L. K.; SILVEIRA, J. R.; RADIN, B.; OLIVEIRA, A. M. Rota de. **Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido**. Ciência Rural (UFSC. Impresso), v. 37, p. 1255-1260, 2007.

LORENZ, G. **Dicarboximide fungicides: history of resistance development and monitoring methods**. In: DELP, C.J. Fungicide resistance in North America. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. chapt. 4, p.45-51.

MAES, M.; HUVENNE, H.; MESSENS, E. ***Brenneria salicis*, the bacterium causing watermark disease in willow, resides as an endophyte in wood**. Environmental Microbiology, Bedford, v. 11, n.6, p. 1453-1462, 2009.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; VENTURA, G. M.; SANFUENTES, E. A. **Encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* na propagação clonal de *Eucalyptus***. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 28, n. 1, p. 101-105, 2003.

MARIANO, R. L. R. **Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas**. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v. I, p. 69- 409, 1993.

MELO, I.S. ***Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas**. Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo. v4, p261-295, 1996.

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.

MORANDI, M. A. B. **Controle biológico de *Botrytis cinerea* por *Clonostachys rosea* como componente do manejo integrado do mofo cinzento em roseiras.** Tese (Doutorado em Agronomia (Fitopatologia)) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2001.

NETO, P. A. de S. P.; AZEVEDO, J. L. & ARAÚJO, W. L. **Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, v.29, p. 62-76, 2002.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. dos; FERREIRA, C. A. **Eucaliptos indicados para plantio no Estado do Paraná.** Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2006. 45 p. (Documentos, 129).

PAULA JÚNIOR, T. J. de; MORANDI, M. A. B.; ZAMBOLIM, L.; SILVA, M. B. da. **Controle Alternativo de Doenças de Plantas – Histórico.** In: VENEZON, M; PAULA JÚNIOR, T. J. de; PALLINI, A. (Eds.). **Controle Alternativo de Pragas e Doenças.** Viçosa: EPAMIG/CTZM, p. 135-162, 2005.

PAULITZ, T.C.; BÉLANGER, R.R. **Biological control in greenhouse systems.** *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 39, p. 103-133, 2001.

PAZ, I. C. P. **Bactérias endofíticas de eucalipto e potencial uso no controle de doenças e promoção de crescimento de mudas em viveiros florestais.** 112 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PENG, G.; SUTTON, J. **Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in Strawberry.** *Can. J. Plant Path.* 13: 247-257, 1991.

PÉREZ-VERA, O. A.; YÁÑEZ-MORALES, MARÍA DE J.; ALVARADO-ROSALES, D.; CIBRIÁN-TOVAR, D.; GARCÍA-DÍAZ, S. E. **Hongos asociados a eucalipto, *Eucalyptus grandis* Hill: Maid.** *Ensayo en Agrociencia* 39: 311-318. 2005.

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. Suplemento. Fitopatologia Brasileira, v. 20, 1995. p. S385.

PINTO, L. S. R. C.; AZEVEDO, J. L.; PEREIRA, J. O.; VIEIRA, M. L. C. & LABATE, C. A. **Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency**. New Phytologist, Lancaster, v. 147, p. 609-615, 2000.

PROCOPIO, R. E. L. **Diversidade de bactérias endofíticas de *Eucalyptus* spp.e avaliação do seu potencial biotecnológico**. 68 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2004.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. **Screening antifungal activitis of selected medicinal plants**. Journal of Ethnopharmacology, v. 74, p. 89 - 96, 2001.

REYNA, R.; ROMERO, G. **Evaluación de métodos biológicos y químicos para el control de *Botrytis cinerea* em viveros de *Eucalyptus globulus***. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 34., 2001. Suplemento. Fitopatologia Brasileira, v. 26, 2001. p. S796.

SANFUENTES, E.; FERREIRA, F. A. **Fungos para a supressão de *Botrytis cinerea* em mudas de eucalipto**. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 26., 1996. **Suplemento**. Fitopatologia Brasileira, v. 21,1996. p. S281.

SCHULTZ, B. **Levantamento de Doenças bióticas e abióticas em *Eucalyptus benthamii* Maiden nos Estados do Paraná e Santa Catarina**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. da S. **Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos**. Revista Floresta. Curitiba, PR. v. 30, nº 1 e 2, p. 129-137. 2000.

SILVA, F. de A. S.; 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 do ... American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVERA-PÉREZ, A. E. **Controle biológico de mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) com *Clonostachys rosea* em cultivos experimental e comercial de mudas de fúcsia**. 92 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia, área de concentração Fitossanidade) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

STROBEL, G. A. **Rainforest endophytes and bioactive products**. Critical review in Biotechnology, Edinburgh, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. **Natural Products from Endophytic Microorganisms**. Journal of Natural Products, Columbus, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

TEIXEIRA, D.A.; ALFENAS, A.C; MAFIA, R.G.; MAFFIA, L.A. & FERREIRA, E.M. **Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas**. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 30, n. 4, p. 350-356, 2004.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. **Controle biológico de doenças de fruteiras de clima temperado**. In: VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. (Cord.). VII Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos. Anais. Bento Gonçalves, RS. p. 61-64. 2001.

VECHIATO, M. H. **Importância da qualidade sanitária de sementes de florestais na produção de mudas**. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal. Instituto Biológico de São Paulo. n 136. 2010. Disponível em:< [http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=136](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=136)> Acesso em: 11/10/2012.

WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, B.; TUDZYNSKI, P.; VAN KAN, J. A. L. ***Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease**. Molecular Plant Pathology, Reading, v.8, n. 5, p. 561-580, 2007.