



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

KAMILLA OTONI MARQUES BATISTA

**POTENCIAL DE COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE *Eucalyptus urophylla* POR
FUNGOS ANTAGÔNICOS ÀS FORMIGAS-CORTADEIRAS**

**GURUPI - TO
2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

KAMILLA OTONI MARQUES BATISTA

**POTENCIAL DE COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE *Eucalyptus urophylla* POR
FUNGOS ANTAGÔNICOS ÀS FORMIGAS-CORTADEIRAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Danival José de Souza

**GURUPI - TO
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

B333p Batista, Kamilla Otoni Marques.
 POTENCIAL DE COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE *Eucalyptus*
urophylla POR FUNGOS ANTAGÔNICOS ÀS FORMIGAS-
CORTADEIRAS.
 / Kamilla Otoni Marques Batista. – Gurupi, TO, 2017.
 55f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) – Universidade Federal do Tocantins –
Campus Universitário de Gurupi – Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em
Produção Vegetal, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Danival José de Souza.

1. Controle microbiano. 2. *Escovopsis* sp. 3. *Metarhizium anisopliae*. 4.
Trichoderma strigosellum. I. Título.

CDD 635

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.



Universidade Federal do Tocantins
Campus de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal

ATA nº 11/2017

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE KAMILLA OTONI MARQUES BATISTA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

Aos 19 dias do mês de dezembro do ano de 2017, às 14:30 horas, na Sala 02 do Bloco PG-PV, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. Danival José de Souza do *Campus* Universitário de Gurupi/ Universidade Federal do Tocantins, Prof. Dra. Raquel Marchesan do *Campus* Universitário de Gurupi/ Universidade Federal do Tocantins, Prof. Dr. Renato de Almeida Sarmiento do *Campus* Universitário de Gurupi/ Universidade Federal do Tocantins, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de KAMILLA OTONI MARQUES BATISTA, intitulada "POTENCIAL DE COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE *Eucalyptus urophylla* POR FUNGOS ANTAGÔNICOS ÀS FORMIGAS-CORTADEIRAS". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, habilitando-a ao título de Mestre em Produção Vegetal. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dra. Raquel Marchesan
Universidade Federal do Tocantins

Dr. Renato de Almeida Sarmiento
Universidade Federal do Tocantins

Dr. Danival José de Souza
Universidade Federal do Tocantins
Orientador e presidente da banca examinadora

Gurupi, 19 de dezembro de 2017.

Dr. Rodrigo Ribeiro Fidelis
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal

Aos meus pais, **Emivane Otoni e Valdir Batista**, pelo incentivo.

Ao meu namorado, **Douglas Holanda**, pela ajuda.

Dedico.

“Na minha fragilidade prefiro parecer uma formiguinha levando uma flor,
do que um gigante pisando jardins.”

(Sirlei L. Passolongo)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela luz divina que guia os meus passos, que me concede força, proteção e vitória.

Aos meus familiares, especialmente meus pais, Emivane Otoni e Valdir Batista, pelo apoio, incentivo e orações.

Ao meu companheiro, Douglas Holanda, por ter suportado comigo as dificuldades desta jornada. Agradeço pela compressão, paciência e amor. Te quero sempre do meu lado!

À minha prima e amiga, Ms. Mariela Otoni, por toda ajuda e paciência, por ter me instruído em momentos importantes ao longo desse caminho, por todos os conselhos, pelas palavras sábias e motivadoras.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Dr. Danival José de Souza, pela oportunidade, paciência, ensinamentos, orientações e pelo exemplo de profissional.

A todos os professores e colegas, pelo conhecimento compartilhado, em especial, ao professor Dr. Rodrigo Ribeiro Fidelis, pela acolhida e pelos momentos de descontração e bom humor e à Ms. Dalmarcia de Souza Carlos Mourão e Dr. Jaiza Francisca Ribeiro Chagas pela ajuda.

Às minhas queridas amigas, Erika Menezes e Wanessa Rocha, por terem tornado essa caminhada mais leve, com muito companheirismo, tempo doado, incansáveis risadas, palavras amigas, incentivos e apoio.

Aos meus colegas do Laboratório de Controle Microbiano de Insetos, Amanda Teles, Cléia de Almeida e Rodrigues Domingos.

À família Alves Holanda, pelo carinho e apoio.

À todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse estudo.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Diversos estudos evidenciam dezenas de espécies de fungos de diferentes gêneros nas colônias de formigas-cortadeiras. No entanto, a procedência desses microrganismos ainda é incerta. Alguns desses podem ser endofíticos oriundos do material vegetal transportado para o ninho. Assim sendo, determinados fungos endofíticos possuem a capacidade de contaminar a colônia das cortadeiras ou influenciar no seu microbioma simbiótico. Com isso, os endófitos fúngicos têm potencial no controle de formigas-cortadeiras como parceiros mutualistas das plantas. Esse sistema simbiótico pode se tornar uma estratégia no manejo dessa importante praga dentro do ecossistema florestal. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de colonização endofítica de mudas de *Eucalyptus urophylla* pelos fungos *Escovopsis* sp., *Metarhizium anisopliae* e *Trichoderma strigosellum*, e analisar, por meio da avaliação de características biométricas, a influência da inoculação desses microrganismos sobre o desenvolvimento das plantas. O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado, usando-se o esquema fatorial 4 x 3, com 15 repetições, sendo cada parcela constituída por uma muda. Os fatores foram: três espécies de fungos (*Escovopsis* sp., *M. anisopliae*, *T. strigosellum*) mais um controle e três métodos de inoculação (inoculação via foliar, inoculação via solo e inoculação via plântula). Para avaliação da colonização endofítica, utilizaram-se dez mudas, sendo cinco destinadas para avaliação das características biométricas. No método de inoculação via plântula, o fungo *T. strigosellum* foi isolado apenas nas raízes. Contudo, no método de inoculação via solo, além das raízes, esse fungo colonizou também o caule. As plantas de *E. urophylla* não foram colonizadas endofiticamente quando inoculadas pelo método de inoculação via foliar. As plantas inoculadas com o fungo *T. strigosellum*, pelo método de inoculação via plântula, apresentaram maiores valores nas características altura de plantas, número de folhas, massa seca da parte aérea e massa seca total quando comparado com os outros métodos de inoculação. Houve incremento também, por esse método, para a variável altura de plantas, quando comparadas às plantas controle e às inoculadas pelos fungos *Escovopsis* sp. e *M. anisopliae*. Dentre os fungos estudados, o isolado *T. strigosellum* colonizou endofiticamente o *E. urophylla* e influenciou positivamente no seu desenvolvimento, quando inoculado via plântula.

Palavras-chave: controle microbiano, endófitos, *Escovopsis* sp., *Metarhizium anisopliae*, *Trichoderma strigosellum*.

ABSTRACT

Several studies evidenced dozens of fungus species of different genera in the colonies of leaf-cutting ants. However, the origin of these microorganisms is still uncertain. Some of these may be endophytes from plant material transported to the nest. Thus, certain endophytic fungi have the ability to contaminate the leaf-cutting ant colony or influence its symbiotic microbiome. Thus, fungal endophytes have the potential to control leaf-cutting ants as mutual plant partners. This symbiotic system could become a strategy in the management of this important forest pest. The objective of this work was to evaluate the potential of endophytic colonization of *Eucalyptus urophylla* plants by fungi *Escovopsis* sp., *Metarhizium anisopliae* e *Trichoderma strigosellum*, and to analyze, by means of the evaluation of biometric characteristics, the influence of the inoculation of these microorganisms on the plant development. Experimental design was completely randomized, using the factorial scheme 4 x 3, with 15 replicates, each plot consisting of one plant. The factors were: three fungi species (*Escovopsis* sp., *M. anisopliae*, *T. strigosellum*) plus one control and three methods of inoculation (foliar inoculation, inoculation via soil and seedling inoculation). For the evaluation of endophytic colonization, ten plants were used; five of them were destined to evaluate the biometric characteristics. In the seedling inoculation method, the *T. strigosellum* fungus was isolated only in the roots. However, in the soil inoculation method, besides the roots, this fungus also colonized the stem. *E. urophylla* plants were not colonized endophytically when inoculated by foliar inoculation method. The plants inoculated with *T. strigosellum* by the seedling inoculation method had higher values in the characteristics of plant height, number of leaves, root dry mass and total dry mass when compared to the other inoculation methods. There was also an increase, by this method, for the plant height variable, when compared to the control plants and those inoculated by the fungi *Escovopsis* sp. and *M. anisopliae*. Among the fungi studied, the isolate *T. strigosellum* endofitically colonized *E. urophylla* and positively influenced its development when inoculated via seedling.

Keywords: microbial control, endophytes, *Escovopsis* sp., *Metarhizium anisopliae*, *Trichoderma strigosellum*.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Local de condução.....	23
3.2 Aquisição dos isolados fúngicos.....	23
3.3 Obtenção de isolados monospóricos.....	23
3.4 Produção de mudas.....	24
3.5 Viabilidade de esporos.....	24
3.6 Preparação dos inóculos.....	25
3.7 Inoculação via foliar e inoculação via solo.....	25
3.8 Inoculação via plântula.....	26
3.9 Avaliação da colonização endofítica.....	27
3.10 Avaliação das características biométricas.....	28
3.11 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	29
4 RESULTADOS.....	30
4.1 Colonização endofítica.....	30
4.2 Características biométricas.....	31
5 DISCUSSÃO.....	38
5.1 Colonização endofítica.....	38
5.2 Características biométricas.....	40
5.3 Perspectivas.....	42
6 CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: [Tratamentos utilizados na avaliação do potencial de colonização endofítica em *Eucalyptus urophylla* pelos fungos *Escovopsis* sp., *Metarhizium anisopliae* e *Trichoderma strigosellum* e para avaliação do efeito da inoculação desses fungos sobre o desenvolvimento das plantas](#).....29

Tabela 2: Número de plantas de *Eucalyptus urophylla* colonizadas endofiticamente pelos fungos inoculados por diferentes métodos e isolados de diferentes partes da planta.....

Tabela 1: Análise de variância de altura de plantas, número de folhas, massa seca da parte aérea, massa seca da raiz e massa seca total de *Eucalyptus urophylla*, em função de métodos de inoculação e fungos inoculados.....

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Isolados fúngicos. A: *Escovopsis* sp. B: *Metarhizium anisopliae*. C: *Trichoderma strigosellum*.....
- Figura 2 - Mudas de *Eucalyptus urophylla* no dia das avaliações da colonização endofítica e das características biométricas, com 12 semanas após a germinação.....
- Figura 3 - A: Pulverização foliar realizada com devidos cuidados para que a pulverização incidisse somente na superfície adaxial da folha. B: Aplicação via solo, na base da planta, com auxílio de um cilindro graduado.....27
- Figura 4 - A: Plântulas em placa de Petri, 3 dias após a germinação. B: Inoculação via plântula, em câmara de fluxo laminar, com auxílio de agulha, pinça e microscópio estereoscópio.....27
- Figura 5 - [Resultados da colonização endofítica de *Eucalyptus urophylla* por *Trichoderma strigosellum*. A: *T. strigosellum* presente em cinco seções de raiz no método de inoculação via plântula; B: Endófito fúngico crescendo a partir de duas seções de caule no método de inoculação via solo; C: O fungo *T. strigosellum* presente em duas seções de raiz de eucalipto no método de inoculação via solo; D e E: Conídios e conidióforos do endófito *T. strigosellum* visualizados sob microscópio óptico.....](#)30
- Figura 6 - Valores médios de altura de plantas (cm) de *Eucalyptus urophylla* tratadas com diferentes métodos de inoculação
- Figura 7 - Valores médios de altura de plantas (cm) de *Eucalyptus urophylla* tratadas com diferentes fungos.....
- Figura 8 - Valores médios de número de folhas de plantas de *Eucalyptus urophylla* tratadas com diferentes fungos.....
- Figura 9 - Valores médios de massa seca da parte aérea (g) de plantas de *Eucalyptus urophylla* tratadas com diferentes fungos.....
- Figura 10 - Valores médios de massa seca total (g) de plantas de *Eucalyptus urophylla* tratadas com diferentes fungos.....
- Figura 11 - Desdobramento da interação para médias de altura de plantas (cm) de *Eucalyptus urophylla*, em função de diferentes métodos de inoculação e diferentes fungos inoculados.....
- Figura 12 - Desdobramento da interação para médias de número de folhas de plantas de *Eucalyptus urophylla*, em função de diferentes métodos de inoculação e diferentes fungos inoculados.....
- Figura 13 - Desdobramento da interação para médias de massa seca da parte aérea (g) de plantas de *Eucalyptus urophylla*, em função de diferentes métodos de inoculação e diferentes fungos inoculados.....

Figura 14 - Desdobramento da interação para médias de massa seca da raiz (g) de plantas de *Eucalyptus urophylla*, em função de diferentes métodos de inoculação e diferentes fungos inoculados.....

Figura 15 - Desdobramento da interação para médias de massa seca total (g) de plantas de *Eucalyptus urophylla*, em função de diferentes métodos de inoculação e diferentes fungos inoculados.....

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as espécies do gênero *Eucalyptus* destacam-se por representar 72% de toda área de florestas plantadas (IBÁ, 2017). As formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) são consideradas as principais pragas desfolhadoras nessas florestas, especialmente as espécies pertencentes ao gênero *Atta* Fabricius, comumente denominadas de saúvas, bem como as do gênero *Acromyrmex* Mayr, também conhecidas como quenquéns (ZANETTI et al., 2003). As formigas-cortadeiras alcançaram o nível de pragas devido aos constantes danos e intensos prejuízos que são causados nas áreas com eucalipto (BURATTO et al., 2012). Os ataques às plantas de eucalipto acontecem desde a fase de viveiro até a rotação final da cultura, sendo que as fases críticas de controle compreendem o pré-plantio e pós-plantio, o início da brotação e o pré-corte (BOARETTO e FORTI, 1997; SANTOS et al., 2008).

Entre as principais espécies de eucalipto cultivadas no Brasil está o *Eucalyptus urophylla* (CIB, 2008). Diversos estudos comprovam a preferência e susceptibilidade de *E. urophylla* por diferentes espécies de formigas-cortadeiras (ANJOS et al., 1986; SANTANA e ANJOS, 1989; DELLA LUCIA et al., 1995; MARSARO JUNIOR et al., 2007). Os danos causados pelas formigas-cortadeiras nas áreas plantadas com *E. urophylla* são resultantes do constante corte de material vegetal fresco utilizado como substrato para nutrir e cultivar o fungo simbiote mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales) que é usado na sua própria alimentação.

Além da interação com o seu fungo simbiote, as formigas-cortadeiras interagem com vários outros microrganismos, incluindo leveduras (CARREIRO et al., 2004), bactérias (SANTOS et al., 2004) e outros fungos filamentosos (LUCIANO et al., 1995; FISHER et al., 1996; RIBEIRO et al., 2012), como os fungos parasitas e antagonistas de *L. gongylophorus*, *Escovopsis* sp. e *Trichoderma* sp., respectivamente (RODRIGUES, 2008) e o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (HUGHES et al., 2004). Alguns trabalhos apontam que a diversidade desses microrganismos no interior das colônias está ligada ao substrato transportado pelas operárias forrageadoras para o interior do ninho para cultivo do fungo (FISHER et al., 1996; VAN BAEL et al., 2009). Recentemente, tem sido demonstrado que muitos fungos endofíticos encontram-se associados às formigas-cortadeiras (VAN BAEL et al., 2009; COBLENTZ e VAN BAEL, 2013; ESTRADA et al., 2013).

Os fungos endofíticos colonizam, adaptam-se e se propagam no interior das plantas. Podem ser isolados de folhas, caules e raízes, e habitar os tecidos vegetais vivos sem

aparentemente prejudicar a planta (AZEVEDO, 1998). O hospedeiro pode até ser beneficiado com a colonização dos fungos endofíticos devido à produção de compostos que promovem o crescimento vegetal e que atuam contra outros microrganismos e animais herbívoros (AZEVEDO et al., 2002). Desse forma, eles podem influenciar e mediar importantes relações nas interações planta-inseto (MILLER et al., 2002; MEISTER et al., 2006; ESTRADA et al., 2013).

Segundo MARCELINO et al. (2008), alguns fungos endofíticos possuem a capacidade de contaminar os insetos ou influenciar no seu microbioma simbiótico. É possível, portanto, que determinados fungos endofíticos ataquem as formigas, sendo capazes de destruir os ninhos diretamente ou indiretamente, ou seja, consumindo o fungo simbiote mutualista das cortadeiras ou competindo com esse simbiote pelo substrato (ROCHA, 2014).

ESTRADA et al. (2013) mostraram em seu estudo que os fungos endofíticos alteram a química da folha. Os compostos liberados da folha depois de um ferimento influenciam na escolha das formigas entre plantas com menor ou maior presença de endófitos no momento do forrageamento. Portanto, os endófitos fúngicos como parceiros mutualistas das plantas têm potencial no controle de formigas-cortadeiras. Esse sistema simbiótico pode tornar-se uma estratégia no manejo dessa importante praga dentro do ecossistema florestal (ROCHA et al., 2017).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de colonização endofítica de mudas de *E. urophylla* pelos fungos *Escovopsis* sp., *M. anisopliae* e *T. strigosellum*, e analisar, por meio da avaliação de características biométricas, a influência da inoculação desses microrganismos sobre o desenvolvimento das plantas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As formigas estão situadas dentro do Reino Animal, filo Arthropoda, classe Insecta, pertencem a ordem Hymenoptera e estão agrupadas em uma única família, Formicidae. A família Formidae contém 21 subfamílias. Entre essas, a subfamília Myrmicinae é a maior e mais diversificada, onde está incluída a tribo Attini, composta por formigas amplamente disseminadas na região Neotropical e restritas às Américas (BOLTON, 2003; BRANDÃO e CANCELLO, 1999; WEBER, 1972). A tribo Attini é constituída atualmente por 297 espécies, distribuída em 15 gêneros. As formigas pertencentes a essa tribo podem ser chamadas de cultivadoras de fungos (BRANDÃO et al., 2011), por depender do cultivo de um fungo simbiote para sua alimentação. Os fungos criados pelas Attini, em sua maioria, são da família Lepiotaceae (Agaricales: Basidiomycota), incluídos na tribo Leucocoprineae, pertencentes aos gêneros *Leucoagaricus* e *Leucocoprinus* (DELLA LUCIA e SOUZA, 2011).

Dentro da tribo Attini, destacam-se as formigas-cortadeiras, conhecidas como saúvas e quenquês, pertencentes, respectivamente, aos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, os mais derivados e estudados da tribo (DELABIE et al., 2011). As formigas-cortadeiras diferenciam das outras aténeas por utilizar partes verdes de plantas para cultivar o seu fungo simbiote (MOREIRA et al., 2011). Deste modo, as verdadeiras formigas-cortadeiras cortam material vegetal fresco, como folhas, brotos, ramos finos e flores, e carregam para dentro do ninho. Esse material é utilizado como substrato para o desenvolvimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, cultivado em câmaras subterrâneas. O material vegetal misturado ao fungo, é conhecido como jardim de fungos (DELLA LUCIA e SOUZA, 2011; SILVA et al., 2006).

O fungo *L. gongylophorus* possui uma estrutura especializada da hifa que acumula nutrientes, denominada gongilídio. O gongilídio é a única fonte de alimento consumido pelas larvas e a rainha, sendo assimilados pelas operárias. Entretanto, as operárias também ingerem seiva da planta durante o corte e a preparação do substrato vegetal (CHAPELA, 1994; LITTLEDYKE e CHERRETT, 1976; WEBER, 1972). Com essa interação, as formigas adquirem seus nutrientes através do fungo. Em troca, o fungo dispõe de um ambiente favorável para o seu crescimento, livres de inimigos, com um farto fornecimento de substrato, cuidados para o seu bom desenvolvimento, além de ser dispersado pela própria formiga para novas colônias (NASCIMENTO et al., 1996; CURRIE, 2002; CURRIE et al., 2003; MEHDIABADI et al., 2006). O fungo exibe um elevado grau de domesticação, além de várias adaptações para viver com as formigas, a interação fungo-inseto evoluiu e ambos são incapazes de viver isoladamente (BRANDÃO et al., 2011).

A importância econômica das formigas-cortadeiras está diretamente ligada ao fato dessas formigas cortarem partes das plantas, principalmente folhas, para cultivar o fungo simbiote. Deste modo, esses insetos causam prejuízos na agricultura e na silvicultura (DELLA LUCIA e SOUZA, 2011). Aproximadamente 15% da produção florestal, nos ecossistemas tropicais, são consumidas pelas cortadeiras (SANTOS et al., 2008). Os danos causados por essas formigas estão associadas ao tamanho e a quantidade de formigueiros presentes na área, grandes ninhos e mais formigueiros no terreno, demandam maiores quantidades de folhas para o desenvolvimento do fungo, causando maiores prejuízos (LOECK et al., 2001).

As formigas-cortadeiras atacam em qualquer fase do crescimento das plantas, desde mudas até plantas adultas, sendo capaz de acarretar a desfolha total da planta, independente da sua idade. Contudo, a idade influencia nas perdas causadas pelas formigas, pois os maiores estragos são ocasionados em mudas, principalmente as recém-plantadas e em plantas mais jovens. Com isso, a vulnerabilidade da floresta na fase inicial do plantio é maior devido as mudas serem mais frágeis. As perdas causadas pelas cortadeiras nesse período podem ser irreversíveis (CHERRETT, 1986; HÖLLDOBLER e WILSON, 1990; VASCONCELOS e CHERRET, 1997). Portanto, as mudas novas não conseguem sobreviver e são prontamente deterioradas pelas formigas em áreas com altas concentrações de formigueiros, sendo o pré-plantio uma das fases críticas de controle (DELLA LUCIA e VILELA, 1993; BOARETTO e FORTI, 1997). Nas plantas, as avarias decorrentes da desfolha causada pelas formigas-cortadeiras começam através da diminuição de área foliar, que é capaz de comprometer a atividade fotossintética das plantas. Os estragos diminuem também a resistência das plantas. Além de torná-las mais suscetíveis ao ataque de doenças e outros insetos. Com isso, as cortadeiras podem reduzir a produção das plantas (FERREIRA, 1989; CANTARELLI et al., 2008).

As formigas-cortadeiras são apontadas como os insetos mais importantes na eucaliptocultura brasileira, danificando o eucalipto desde do viveiro até a rotação final da cultura. Nos reflorestamentos de eucalipto, devido a sua ampla ocorrência, aos intensos ataques e aos prejuízos constantes, as formigas-cortadeiras alcançaram o nível de principal praga, encontrando-se no topo de importância dessa cultura (ANTUNES e DELLA LUCIA, 1999; SANTOS et al., 2008; BURATTO et al., 2012).

Segundo SANTOS et al. (2008), os investimentos no controle das cortadeiras são dispendiosos, mas necessários, já que a produção da madeira é reduzida em um terço devido ao desfolhamento ocasionado por essas formigas. Caso ocorra no primeiro ano, a perda total

pode alcançar cerca de 13% da colheita. O controle necessário para essas pragas podem chegar, no final do terceiro corte, a 30% do investimento total. No manejo integrado de pragas 75% dos recursos são destinados ao controle das formigas-cortadeiras, sendo usados também para o controle 5% do custo de implantação. As perdas causadas pelas desfolhas realizadas pelas saúvas podem alcançar 1,2 bilhão de árvores por ano, considerando quatro formigueiros adultos/ha. Os dados podem atingir um custo de U\$8,26 por árvore destruída. Esse valor triplica, quando são para produção de celulose (DELLA LUCIA e SOUZA, 2011).

No estudo realizado por FREITAS e BERTI FILHO (1994), a espécie *Eucalyptus grandis*, com 100% de desfolha reduziu 45,5% da produção individual de madeira. As espécies *E. citriodora*, *E. camaldulensis* e *E. tereticornis* foram afetadas significativamente pelos desfolhamentos ocasionadas pelas saúvas (ZANETTI et al., 2003), reduzindo o volume final da madeira, respectivamente em 3,26%, 0,68% e 1,78% por incremento unitário em cada espécie (ZANETTI et al., 2003). AMANTE (1972) relata prejuízos de 14% causados pela desfolhas de *Atta sexdens* em áreas reflorestadas com eucalipto, na presença de quatro saúveiros por hectare. As quenquéns, com densidade de 200 colônias/ha, são capazes de acarretar perdas de 30% em plantios de eucalipto (MENDES FILHO, 1981). Com alta infestação de formigueiros são capazes de reduzir 50% do povoamento de eucalipto desfolhando plantas adultas. Uma colônia adulta/ha de quenquéns causa desfolhamento de 6 a 8 árvores de eucalipto por ano (PEREIRA, 2007).

A espécie *E. urophylla* é vulnerável aos ataques de diferentes espécies de formigas-cortadeiras. No estudo de SANTANA e ANJOS (1989) a espécie *E. urophylla* foi altamente susceptível ao carregamento foliar de *A. sexdens rubropilosa*. Em um estudo similar o mesmo resultado foi obtido por ANJOS et al. (1986). De acordo com os resultados de MARSARO JUNIOR et al. (2007) a espécie *E. urophylla* está entre as espécies mais atrativas estudadas por ele ao ataque de *Acromyrmex laticeps nigrosetosus*. DELLA LUCIA et al. (1995), em um estudo com a formiga-cortadeira *Acromyrmex subterraneus subterraneus* averiguaram a preferência desta espécie por folhas de *E. urophylla*.

Devido à importância das formigas-cortadeiras, diversos estudos estão sendo desenvolvidos com ênfase em técnicas de controle para diminuir as perdas causadas por esses insetos. Essas metodologias visam garantir a produtividade das culturas atacadas pelas cortadeiras (MARINHO et al., 2006). Contudo, a implantação de métodos de controle para as formigas-cortadeiras é dificultada pelas características biológicas e comportamentais desses insetos, a exemplo da elaborada organização social e complexa interação formiga, fungo simbiote e planta. Pode-se citar também o alto grau de polimorfismo e polietismo presentes

nas colônias, uma grande produção de substâncias anti-microbianas e um eficiente sistema de proteção da rainha. A localização, a arquitetura, o tamanho dos ninhos e a atividade de forrageamento também são outros fatores que atrapalham a obtenção de melhores resultados (HEBLING et al., 1994; MARINHO et al., 2006; RIBEIRO e MARINHO, 2011).

Dentre os métodos de controles utilizados no manejo integrado de formigas-cortadeiras se destaca o método químico, com o uso de termonebulização e de iscas atrativas com o princípio ativo. Os métodos mecânico, cultural e resistência de plantas também são utilizados com certa frequência (DELLA LUCIA e VILELA, 1993; BOARETTO e FORTI, 1997; LOECK et al., 2001). Outras formas de combate a populações de formigas-cortadeiras estão sendo amplamente estudadas, como o controle biológico, que visa à utilização de inimigos naturais no combate as formigas-cortadeiras (OLIVEIRA et al., 2011). Esse método procura estabelecer um equilíbrio entre os organismos, reduzindo a população de formigas-cortadeiras a um nível que não cause danos econômicos e ambientais, regulando assim as populações de insetos. Os pássaros, aranhas, lagartos, besouro, sapos, parasitoides, microrganismos como fungos, as bactérias, os vírus e outras espécies de formigas são exemplos de inimigos naturais das formigas-cortadeiras (BERTI FILHO, 2011).

O controle de insetos por meio de agentes biológicos é uma alternativa na busca de produtos e técnicas mais específicas e de menores impactos ao ambiente. Os fungos filamentosos têm apresentado resultados satisfatórios, comparados aos agentes biológicos usados no controle das formigas. Os fungos presentes naturalmente no solo, que são entomopatogênicos ou antagonistas do jardim de fungo das formigas-cortadeiras, são visados nos estudos para o controle das cortadeiras, por serem capazes de infectar os ninhos, além de serem adaptados ao microclima do interior do formigueiro (BOARETTO e FORTI, 1997; LOPEZ e ORDUZ, 2003).

Os fungos entomopatogênicos são inimigos naturais de várias espécies de insetos, até mesmo das formigas-cortadeiras, regulando as suas populações e atuando no controle microbiano natural desses insetos. Esses patógenos de insetos estão ocorrendo por meio de enzootias e epizootias naturalmente (JACCOUD et al., 1999; LEITE et al., 2003). Os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* foram encontrados em estudos com rainhas do gênero *Atta* (ALVES e SOSA GÓMES, 1983; DIEHL-FLEIG et al., 1992; JACCOUD et al., 1999). Esses fungos ascomicetos são generalistas e bastante virulentos, sendo amplamente utilizados em estudos de controle microbiano de insetos pragas (HUGHES et al., 2004). Quando estudados em laboratórios, os fungos *Metarhizium* p. e *Beauveria* spp. comprovaram sua eficiência no controle das formigas-cortadeiras, uma vez

que foram capazes de matar as colônias (ORTIZ e ORDUZ, 2001; LOPEZ e ORDUZ, 2003; SILVA et al., 2006). Os resultados variam dependendo de vários fatores, entre eles as espécies, a casta e a forma de aplicação dos microrganismos que estão sendo estudadas (DIEHL-FLEIG e SILVA 1986; DIEHL-FLEIG et al., 1988; SPECHT et al., 1994; LOUREIRO e MONTEIRO, 2004).

O fungo filamentoso ascomiceto *M. anisopliae* foi isolado a partir de larvas do besouro *Anisopliae austriaca* e descrito por METSCHNIKOFF em 1879. Esse fungo é distribuído amplamente na natureza, sendo facilmente encontrado nos solos onde permanece por longos períodos. Está presente nas rizosferas de plantas e é isolado frequentemente de artrópodes infectados (ALVES et al., 1998; ZIMMERMANN, 2007; SCHRANK e VAINSTEIN, 2010). Entre os microrganismos importantes para o controle de pragas na agricultura, foi o primeiro a ser reconhecido, por ser patogênico a diversas espécies de artrópodes, naturalmente em mais de 300 espécies de insetos (ALVES, 1998; FRAZZON et al., 2000).

O fungo *M. anisopliae* é responsável por causar uma infecção fúngica conhecida como “muscardine verde”, onde os cadáveres de artrópodes atingidos por esse fungo ficam incrustados com proliferação de conídios verdes (ROBERTS e ST. LEGER, 2004). Os fungos, de forma geral, produzem enzimas capazes de converter, os tecidos dos insetos, em nutrientes. Entretanto, os insetos possuem uma cutícula esclerotizada que não pode ser utilizadas pelos fungos, exceto pelos fungos entomopatogênicos que produzem enzimas, como as quitinases, proteases e lipases que são capazes de degradar essa cutícula que é uma camada protetora dos insetos (DIAS, 2005). Desse modo, o esporo do fungo *M. anisopliae*, em contato com a cutícula do inseto germina e produz muitas enzimas que degradam a cutícula, as hifas colonizam o interior do inseto e inativam as células, ocasionando assim, a morte do mesmo (FILHO, 2003).

Os fungos do gênero *Trichoderma* e *Escovopsis* estão entre os microrganismos associados ao fungo simbionte cultivado pelas formigas-cortadeiras, sendo antagonista e micoparasita, respectivamente, do fungo *L. gongylophorus* (ORTIZ e ORDUZ, 2001; CURRIE et al., 2003; LOPEZ e ORDUZ, 2003; SILVA et al., 2006; FOLGARAIT et al., 2011).

Alguns microrganismos são obtidos a partir do solo ou são carregados pelas operárias para o interior do ninho, ameaçando as atíneas. Como os fungos *Trichoderma* spp., que são antagonistas dos jardins de fungos das cortadeiras (RODRIGUES et al., 2008). No estudo desenvolvido por RODRIGUES et al. (2005) grande parte dos fungos que foram encontrados

nos jardins de formigas do gênero *Acromyrmex* e em *A. sexdens rubropilosa* pertencem a gêneros que estão presentes habitualmente no solo. Sendo que o fungo *Trichoderma harzianum* foi adquirido de um ninho em campo com uma frequência de 38%, considerada elevada. Diferentes espécies de *Trichoderma* estão sendo amplamente usadas no controle biológico das formigas-cortadeiras (AUGUSTIN et al., 2011).

Trichoderma (Ascomycota: Hypocreaceae) é um gênero de fungos filamentosos que reúne espécies comumente encontradas no solos, de ocorrência natural, principalmente naqueles solos ricos em matéria orgânica (SAMUELS, 2006). Algumas espécies desse gênero são usadas no controle de fungos fitopatogênicos de culturas importantes da agricultura. Entretanto, alguns foram testados também contra o fungo cultivado pelas atíneas. Várias espécies de *Trichoderma* destacam-se em estudos de fungos como agentes de controle biológico, sendo que as espécies desse gênero correspondem a maioria dos agentes microbianos avaliados pelos pesquisadores (HARMAN, 2000).

As espécies de *Trichoderma* são bastante utilizadas como agentes de biocontrole devido as características apresentadas por esses indivíduos, como alta capacidade adaptativa e de reprodução, habilidades de sobrevivência em condições adversas, além disso, são capazes de utilizar os nutrientes do meio com eficiência. Esses fungos apresentam grande potencial de dispersão, são agressivos contra outros fungos e destacam-se por promover para planta mecanismos de defesa e crescimento. Com isso, os fungos desse gênero estão presente em grande concentração em muitos ambientes (MONTE, 2001; BENÍTEZ et al., 2004).

A ocorrência do fungo *Escovopsis* sp. foi primeiramente mencionada por MÖLLER (1893), porém foi descrita formalmente por MUCHOVEJ e DELLA LUCIA, em 1990. Esse fungo é encontrado nos jardins de fungos de quase todas as atíneas. Estão associados ao ninho dessas formigas, por não ter sido isolado ainda de nenhum outro lugar (CURRIE et al., 1999). O fungo *Escovopsis* sp. é considerado um parasita especializado do fungo cultivado pelas formigas. Estudos indicam que as formigas-cortadeiras, o fungo cultivado e o *Escovopsis* sp. co-evoluíram em uma relação tripartida (CURRIE et al., 2003).

Os conhecimentos sobre a biologia e o ciclo de vida de *Escovopsis* sp. são escassos. Sabe-se que esse fungo é altamente patogênico, apresentando um rápido crescimento micelial, recobrando em 72 horas os jardins de fungo das formigas-cortadeiras sem a presença das formigas operárias. Esse parasita secreta substâncias que agem contra o fungo simbiote, degradando suas células e absorvendo os nutrientes liberados (CURRIE et al., 1999; REYNOLDS e CURRIE, 2004; PAGNOCCA et al., 2011).

O fungo *Escovopsis* sp. quando infecta o jardim de fungo é capaz de ocasionar a morte da colônia, diminuindo a biomassa do jardim, a produção de pupas, larvas e operárias, condenando o crescimento do formigueiro (CURRIE, 1999; CURRIE, 2001). O parasita *Escovopsis* sp. pode ser controlado pelas operárias quando infecta o jardim de fungo, por meio da retirada do pedaços do jardim que foram infectados (CURRIE e STUART, 2001). Outra forma é através das bactérias *Pseudonocardia* sp. que estão presentes nas cutículas das operárias que apresentam atividade inibitória ao fungo *Escovopsis* sp. (CURRIE et al., 1999).

Para potencializar o controle das formigas-cortadeiras, FOLGARAIT et al. (2011) e SILVA et al. (2006) recomendam o uso de forma combinada dos fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium* sp. com os fungos antagonistas e micoparasitas, como *Trichoderma* sp. e *Escovopsis* sp.

Recentemente, os fungos endofíticos de plantas foram incluídos como microrganismos associados às formigas-cortadeiras (VAN BAEL et al., 2009; COBLENTZ e VAN BAEL, 2013; ESTRADA et al., 2013). DE BARY (1866) apresentou uma possível diferença entre os patógenos de plantas e os fungos endofíticos, quando mencionou fungos que vivem dentro da tecido vegetais. Desde então, existem várias divergências entre autores sobre a definição mais adequada para fungos endofíticos. A definição mais aceita é que são fungos que vivem no interior dos tecidos e órgãos vegetais de forma assintomática, por pelo ao menos um período do seu ciclo de vida, sem ocasionar aos seus hospedeiros nenhuma detrimento aparente (PETRINI, 1991; CABRAL et al., 1993). Diferentemente dos fungos epifíticos, que estão presentes na superfície dos tecidos vegetais, e dos fungos patogênicos que são danosos as plantas, causando-lhes doenças (AZEVEDO, 1998; SOUZA et al., 2004).

Os fungos endofíticos estão associados a várias partes das plantas, como folhas, caules, raízes e nas estruturas das flores (ARAÚJO et al., 2002). Esses microrganismos colonizam os tecidos vegetais através da penetração dos esporos, de aberturas naturais como os estômatos e através de ferimentos. Pelas raízes, que podem apresentar aberturas devido fissuras do crescimento ao penetrar no solo ou da emergência de raízes laterais, pelas sementes. Através de aberturas causadas por insetos ou diretamente com inoculação dos esporos. A penetração pode ser também pelos apressórios, que são usados por fungos patogênicos para adentrar no tecido vegetal (CARROLL, 1988; AZEVEDO, 1998; PEIXOTO NETO et al., 2002).

Os fungos endofíticos apresentam diversas relações com os seus hospedeiros, são neutros quando não exibem nenhum efeito detectável na planta, podendo ser também simbioses mutualistas, saprofíticos ou patógenos latentes (BACON e WHITE, 2000;

SCHULZ e BOYLE, 2005; KOGEL et al., 2006). Alguns estudos relatam uma interação simbiótica entre o hospedeiro e o fungo endofítico, demonstrando as diversas funções ecológicas que proporcionam vantagens e benefícios para ambos. O fungo recebe da planta abrigo e um habitat com bastante nutrientes, recebendo nutrição necessária, aumentando e favorecendo a sua sobrevivência (PEIXOTO NETO et al., 2004), além de ser disseminado pelo hospedeiro via transmissão vertical para próxima geração (FAETH e FAGAN, 2002; MÜLLER e KRAUSS, 2005). As plantas são favorecidas pela presença do fungo endofítico por promover a sanidade das mesmas, pois através desses microrganismos a planta aumenta a resistência contra fatores abióticos e bióticos (SCHARDL et al., 2004; CLAY e SCHARDL, 2002), protegendo contra doenças (HANADA et al., 2008; OWNLEY et al., 2008; GAO et al., 2010), podendo ser repelente contra insetos (AKELLO et al., 2007), promovendo seu crescimento (HAMAYUN et al., 2010; KHAN et al., 2012) e decompondo tecidos mortos (KUMARESAN e SURYANARAYANAN, 2002; HYDE e SOYTONG, 2008; OSES et al., 2008). O fungo aumenta o desempenho da planta por meio da excreção de metabólitos (SCHULZ et al., 1995), protegendo a planta e a si mesmo (CLAY, 1988).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de condução

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Fitossanidade do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e em casa de vegetação, na Universidade Federal do Tocantins, *Campus* Universitário de Gurupi, situado na região sul do estado do Tocantins.

3.2 Aquisição dos isolados fúngicos

Todos os fungos foram obtidos do Laboratório de Controle Microbiano de Insetos da Universidade Federal do Tocantins, no *Campus* Universitário de Gurupi, em 2015 (Figura 1). O isolado de *Escovopsis* sp. (isolado ESC 001, depositado na coleção microbiana da UNESP Rio Claro com o código LESF 1110) foi proveniente da câmara de lixo de um ninho da formiga-cortadeira *Acromyrmex balzani*, localizado no *Campus* Universitário de Gurupi, enquanto o isolado de *Metarhizium anisopliae* foi obtido por uma larva de *Tenebrio molitor* mantida em contato com solo de mata do *Campus* Universitário de Gurupi empregando-se a técnica de isca (Depositado na Coleção Microbiana da UNESP com o código CRM 1397). O fungo *Trichoderma strigosellum* (isolado TCD 003) foi obtido de uma amostra de solo proveniente de uma área de Cerrado *stricto sensu* no *Campus* Universitário de Gurupi.

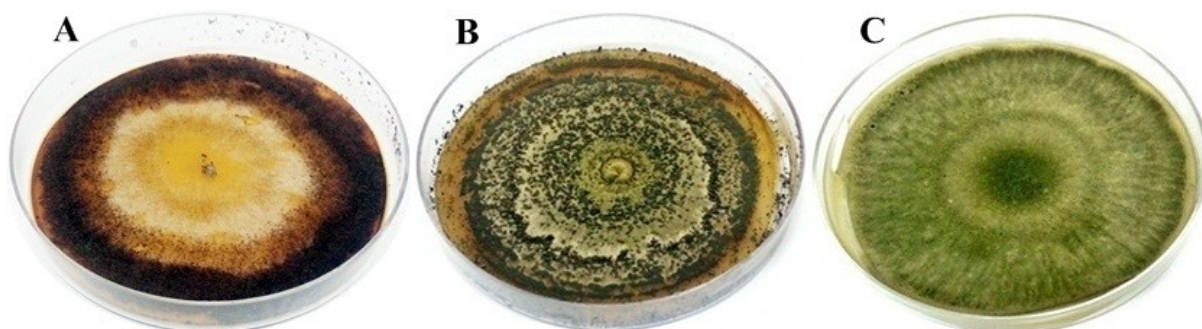


Figura 2 - Isolados fúngicos. A: *Escovopsis* sp. B: *Metarhizium anisopliae*. C: *Trichoderma strigosellum*.

3.3 Obtenção de isolados monospóricos

Para assegurar a presença de única raça da espécie foram obtidas colônias monospóricas para todos os isolados, conforme a técnica de cultura monospórica descrita por FERNANDEZ (1993). Sob condições assépticas em câmara de fluxo, preparou-se uma suspensão fúngica de cada fungo. Os esporos foram colhidos com auxílio de uma agulha de níquel-cromo, previamente flambada, e em um tubo Eppendorf. Os esporos foram suspensos

em 1 mL de água destilada esterilizada com espalhante adesivo (Tween 80) a 0,1% (v/v) para a dispersão dos esporos e agitados em agitador tipo vórtex por 10 segundos afim de homogeneizar. Em seguida, aplicou-se 100 µL da suspensão com auxílio de pipeta automática na superfície do meio ágar-água contido em placas de Petri, onde a suspensão foi espalhada com auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram seladas e incubadas até germinação dos esporos em câmara climatizada a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas. Após a germinação, em microscópio estereoscópico foi localizado um esporo isolado. Cortou-se o pedaço do ágar com auxílio de um escalpelo e utilizando-se uma agulha esse único esporo foi transferido para placa de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) suplementado com 250 mg/L de cloranfenicol, com cuidado para não ocorrer contaminação do ágar e/ou do instrumento de transferência. As placas foram seladas e encaminhadas para câmara climatizada a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas, para o desenvolvimento dos fungos.

3.4 Produção de mudas

As 120 mudas de eucalipto foram produzidas por semeadura direta em sacos de polietileno preto (12,5 x 12,5 cm), sendo 60 delas destinadas para inoculação via foliar, 60 usadas para inoculação via solo. O substrato utilizado foi o comercial Bioflora®, composto de casca de pinus/eucalipto, fibra de coníferas, carvão vegetal, rocha calcária, superfosfato simples, nitrato de amônia e casca de arroz. Para reduzir a incidência de microrganismos contaminantes, esse substrato foi autoclavado à 120°C durante 30 minutos.

As sementes de *Eucalyptus urophylla* cultivar LCFA 013 foram adquiridas na empresa Sementes Caiçara Ltda. Em cada saco foram semeadas cinco sementes e após 30 dias da semeadura, foi conduzido o raleio das plantas, deixando apenas a muda mais vigorosa e centralizada por saco. Com auxílio de um regador, as mudas foram regadas diariamente, até o dia das avaliações, as quais foram realizadas 12 semanas após a germinação. As inoculações via foliar e via solo foram realizadas oito semanas após a germinação das sementes.

3.5 Viabilidade de esporos

Para a avaliação da viabilidade dos esporos dos fungos, primeiramente, preparou-se uma suspensão fúngica sob condições assépticas, em câmara de fluxo, em seguida, 100 µL dessa suspensão foi inoculada no centro de placa de Petri em meio de cultura BDA com 250 mg/L de cloranfenicol, sendo espalhada com auxílio de uma espátula de Drigalsky. As placas

foram seladas e incubadas para germinação em câmara climatizada a 26 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas. A avaliação da viabilidade procedeu-se após 24h da inoculação, inspecionou-se em microscópio óptico três grupos aleatórios de 100 esporos, contando os esporos viáveis para estimar a porcentagem de germinação. Os esporos considerados viáveis, foram aqueles que apresentaram o tubo germinativo mais longo da metade do diâmetro do esporo. Os inóculos foram preparados quando a percentagem média de germinação excedeu 70%.

3.6 Preparação dos inóculos

Os inóculos foram obtidos de colônias puras desenvolvidas em meio BDA suplementado com 250 mg/L de cloranfenicol, mantidas em placas de Petri por sete dias para o fungo *Trichoderma strigosellum* e 15 dias para o fungos *Escovopsis* sp. e *Metarhizium anisopliae*. Para obtenção da suspensão de esporos, sob condições assépticas em câmara de fluxo, adicionou-se sobre a placa 10 mL de água destilada esterilizada com espalhante adesivo (Tween 80) a 0,1% (v/v) e raspou-se delicadamente a superfície do meio com auxílio de um pincel. Essa suspensão foi filtrada em camada tripla de gaze esterilizada para retenção dos fragmentos de micélio e restos de meio de cultura. Diluições necessárias foram realizadas para quantificação dos esporos. Procedeu-se a contagem de esporos/mL utilizando-se a câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico e contador manual. Os inóculos foram ajustados à concentração de 10^8 esporos/mL.

3.7 Inoculação via foliar e inoculação via solo

Como descrito por PARSA et al. (2013), com algumas modificações, na inoculação via foliar as suspensões de esporos dos fungos *Escovopsis* sp., *Metarhizium anisopliae* e *Trichoderma strigosellum* foram pulverizadas após escovação da folha, com o auxílio de um atomizador manual, no par intermediário de cada planta, na superfície adaxial na folha até atingir a saturação, tomando os devidos cuidados para que a pulverização incidisse somente na área foliar desejada da planta (Figura 2A). Nas mudas do grupo controle, pulverizou-se água destilada esterilizada com espalhante adesivo (Tween 80) a 0,1% (v/v). As folhas pulverizadas foram marcadas com marcador d'água.

Na inoculação via solo, as suspensões de esporos dos fungos *Escovopsis* sp., *Metarhizium anisopliae* e *Trichoderma strigosellum* foram aplicadas com auxílio de um

cilindro graduado, na superfície do solo, na base da planta (Figura 2B). Nas mudas controle, aplicou-se água destilada esterilizada com espalhante adesivo (Tween 80) a 0,1% (v/v).

Após as inoculações, cobriram-se as plantas com saco plástico transparente e as mudas foram transferidas para casa de vegetação. A fim de manter um alto nível de umidade as mudas permaneceram cobertas por 48 horas.

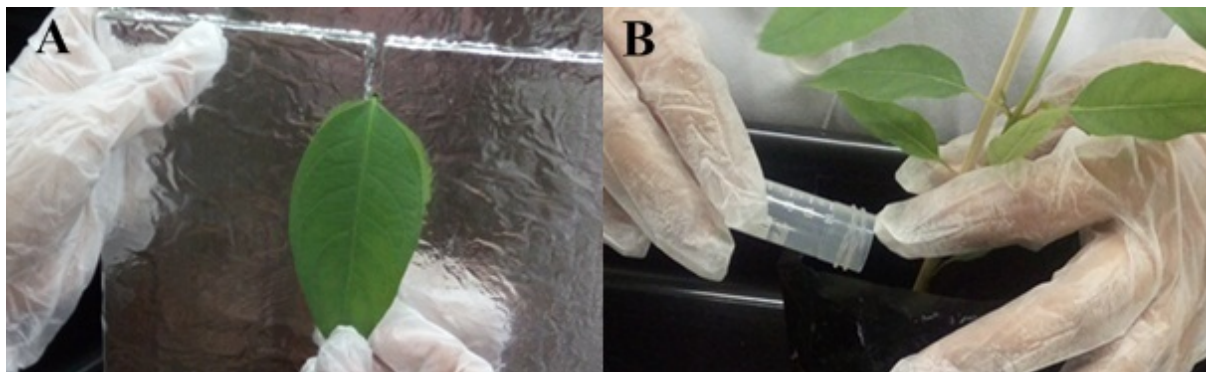


Figura 2 - A: Pulverização foliar realizada com devidos cuidados para que a pulverização incidisse somente na superfície adaxial da folha. B: Aplicação via solo, na base da planta, com auxílio de um cilindro graduado.

3.8 Inoculação via plântula

Para a obtenção das plântulas (Figura 3A), as sementes de *Eucalyptus urophylla* foram esterilizadas superficialmente por 10 minutos em hipoclorito de sódio a 1% e lavadas por três vezes em água destilada esterilizada. Posteriormente, foram distribuídas 75 sementes em quatro placas de Petri com meio ágar-água, totalizando 300 sementes. As placas foram seladas com papel filme e incubadas em câmara climatizada a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas. A inoculação foi realizada sete dias após a germinação das sementes, escolhendo as 15 plântulas mais vigorosas em cada placa.

Como descrito por SIVIEIRO (2001), com algumas modificações, a inoculação foi feita com auxílio de uma agulha. Primeiramente a agulha foi infestada através do micélio do patógeno retirado de colônias em placas de Petri por três dias para o fungo *Trichoderma strigosellum*, e sete dias para os fungos *Escovopsis* sp. e *Metarhizium anisopliae*. Em seguida, segurou-se a plântula com uma pinça e realizou-se pequenos ferimentos no caule das plântulas com a agulha e com auxílio de um microscópio estereoscópio, permitindo assim o contato do patógeno com o interior das plântulas (Figura 3B). Nas plântulas controle, realizou-se apenas o ferimento sem a presença do micélio do patógeno. Após a inoculação, as placas novamente foram seladas com papel filme e incubadas em câmara climatizada a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas. Depois de sete dias da inoculação as plântulas foram transferidas

para saco de polietileno preto (12,5 x 12,5 cm) com substrato comercial Bioflora® autoclavado. Com auxílio de um regador, as mudas foram regadas diariamente, até o dia das avaliações, as quais foram realizadas 12 semanas após o germinação.

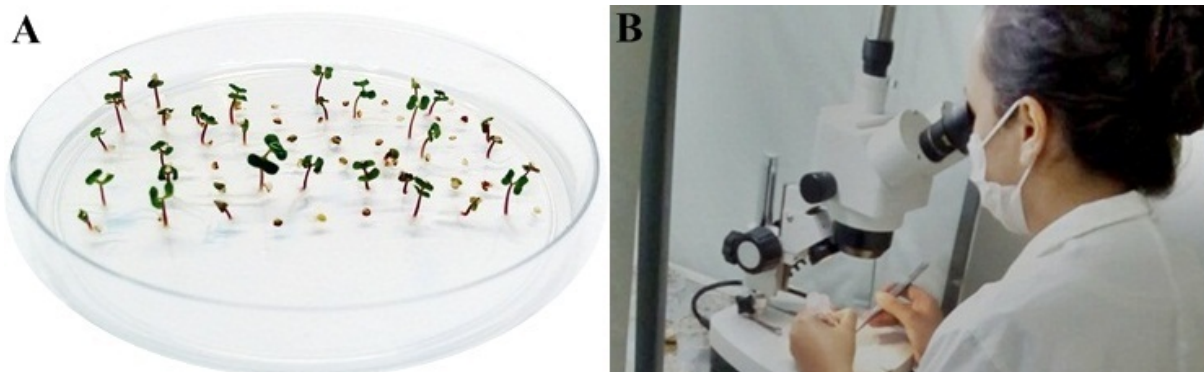


Figura 3 - A: Plântulas em placa de Petri, 3 dias após a germinação. B: Inoculação via plântula, em câmara de fluxo laminar, com auxílio de agulha, pinça e microscópio estereoscópio.

3.9 Avaliação da colonização endofítica

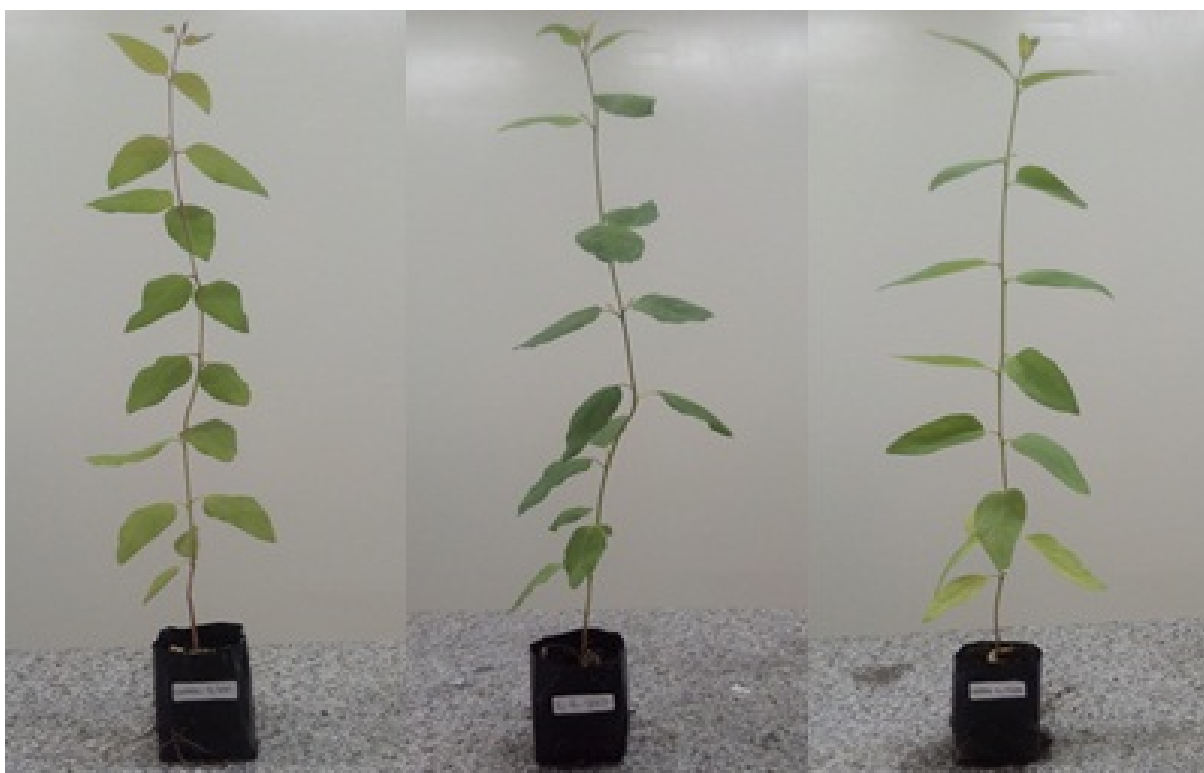


Figura 4 - Mudas de *Eucalyptus urophylla* no dia das avaliações da colonização endofítica e das características biométricas, com 12 semanas após a germinação.

Conforme PARSA et al. (2013) e ROCHA et al. (2017), com algumas modificações, para a avaliação da colonização endofítica, as mudas (Figura 4) foram desarranjadas cuidadosamente, onde primeiramente processou-se as folhas, posteriormente os caules e por

último as raízes. Nas mudas tratadas com a inoculação via foliar, usou-se como referência o par de folhas inoculadas. Coletaram-se o par de folhas acima e o par de folhas abaixo, 5 cm de caule acima e 5 cm caule abaixo, do local da inoculação. Nas mudas inoculadas via solo, coletaram-se os dois primeiros pares de folhas e dois fragmentos de 5 cm de caule acima do solo. Para as mudas do método de inoculação via plântula, coletaram-se quatro folhas aleatoriamente. Na parte intermediária da planta, foram retirados dois fragmentos de 5 cm de caule. De cada folha, foi recortado um pedaço de 3 cm². As raízes foram lavadas em água corrente, e coletou-se um pedaço no meio da raiz principal, 1 cm atrás do colo.

Em câmara de fluxo laminar, os pedaços das folhas foram esterilizados superficialmente através de imersão sequencial em álcool 70% em um minuto e em quatro minutos em hipoclorito de sódio a 1% lavando-se três vezes em água destilada esterilizada. Após a esterilização superficial, as extremidades foram recortadas, com auxílio de uma tesoura esterilizada. De cada folha, foram recortados três pedaços de 0,5 cm². Posteriormente, com o auxílio de uma pinça, seis pedaços foram transferidos para placa de Petri com meio de cultura BDA suplementado com 250 mg/L de cloranfenicol. Para cada muda, foram preparadas duas placas de Petri, sendo uma para cada par de folhas.

Os pedaços de caule e raiz foram esterilizados superficialmente por meio de imersão sequencial durante 2 minutos em hipoclorito de sódio a 1% e dois minutos em solução de álcool a 70% lavando-se três vezes em água destilada esterilizada. As extremidades foram descartadas e de cada pedaço foram cortados três pedaços de 0,5 cm, os quais foram partidos ao meio com auxílio de um bisturi. Os seis pedaços foram transferidos para uma placa de Petri com meio de cultura BDA suplementado com 250 mg/L de cloranfenicol. Para cada planta, foram preparadas duas placas com os pedaços de caule e duas placas com os pedaços de raiz. As placas foram seladas e incubadas a 25°C ± 2°C, com fotoperíodo de 12 horas em câmara climatizada. Para avaliar o sucesso da esterilização, plaquearam-se também 100 µL da última água de lavagem após esterilizar cada parte da planta. Todas as placas foram inspecionadas diariamente por 20 dias para observar e registrar o crescimento dos fungos.

3.10 Avaliação das características biométricas

Conforme descrito por GOMES et al. (2013), com algumas modificações, para analisar o efeito da inoculação dos fungos sobre o desenvolvimento das plantas foram avaliadas as seguintes características biométricas: altura de plantas, número de folhas, massa seca da parte aérea, massa seca da raiz e massa seca total.

A altura da planta foi obtida em centímetros, medindo a partir da base da planta até o ápice da parte aérea, com auxílio de uma régua milimetrada. O número de folhas foi obtido através do somatório das folhas de cada exemplar. A parte aérea das plantas foi cortada e as raízes foram separadas e lavadas em água corrente, ambas as partes das plantas foram acondicionadas em sacos de papel. Os sacos contendo as devidas partes das plantas foram secos em estufa (65 °C) tomando-se os valores de massa seca após secagem por 48 horas, por meio de uma balança analítica Shimadzu® modelo AUW220D.

3.11 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado, usando-se o esquema fatorial 4 x 3, com 15 repetições, sendo cada parcela constituída por uma muda. Os fatores foram: três espécies de fungos (*Escovopsis* sp., *Metarhizium anisopliae*, *Trichoderma strigosellum*) mais um controle e três métodos de inoculação (inoculação via foliar, inoculação via solo e inoculação via plântula). Para avaliação da colonização endofítica, utilizaram-se dez mudas, sendo cinco destinadas para avaliação das características biométricas.

Tabela 2. Tratamentos utilizados na avaliação do potencial de colonização endofítica em *Eucalyptus urophylla* pelos fungos *Escovopsis* sp., *Metarhizium anisopliae* e *Trichoderma strigosellum* e para avaliação do efeito da inoculação desses fungos sobre o desenvolvimento das plantas.

Tratamentos	Número de plantas	
	Colonização endofítica	Características biométricas
<i>Escovopsis</i> sp. x Inoculação via foliar	10	5
<i>Metarhizium anisopliae</i> x Inoculação via foliar	10	5
<i>Trichoderma strigosellum</i> x Inoculação via foliar	10	5
Controle x Inoculação via foliar	10	5
<i>Escovopsis</i> sp. x Inoculação via solo	10	5
<i>M. anisopliae</i> x Inoculação via solo	10	5
<i>T. strigosellum</i> x Inoculação via solo	10	5
Controle x Inoculação via solo	10	5
<i>Escovopsis</i> sp. x Inoculação via plântula	10	5
<i>M. anisopliae</i> x Inoculação via plântula	10	5
<i>T. strigosellum</i> x Inoculação via plântula	10	5
Controle x Inoculação via plântula	10	5

Os dados obtidos das características biométricas foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2011).

4 RESULTADOS

4.1 Colonização endofítica

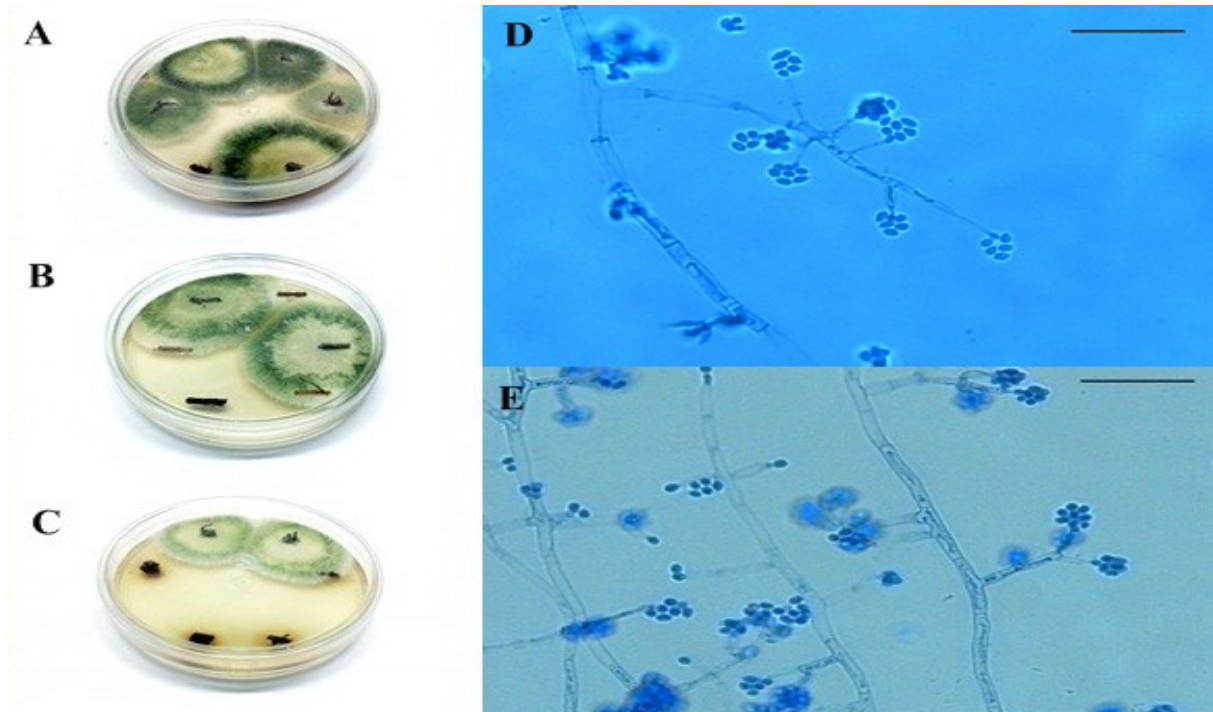


Figura 5 - Resultados da colonização endofítica de *Eucalyptus urophylla* por *Trichoderma strigosellum*. A: *T. strigosellum* presente em cinco seções de raiz no método de inoculação via plântula; B: Endófito fúngico crescendo a partir de duas seções de caule no método de inoculação via solo; C: O fungo *T. strigosellum* presente em duas seções de raiz de eucalipto no método de inoculação via solo; D e E: Conídios e conidióforos do endófito *T. strigosellum* visualizados sob microscópio óptico, ampliado 400x. A barra de escala corresponde a 10 μ m.

Tabela 3. Número de plantas de *Eucalyptus urophylla* colonizadas endofiticamente pelos fungos inoculados por diferentes métodos e isolados de diferentes partes da planta.

Métodos de inoculação	Fungos + Controles	Partes da planta		
		Folha	Caule	Raiz
Inoculação via foliar	Controle	0/10	0/10	0/10
	<i>Escovopsis</i> sp.	0/10	0/10	0/10
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	0/10	0/10	0/10
	<i>Trichoderma strigosellum</i>	0/10	0/10	0/10
Inoculação via foliar	Controle	0/10	0/10	0/10
	<i>Escovopsis</i> sp.	0/10	0/10	0/10
	<i>M. anisopliae</i>	0/10	0/10	0/10
	<i>T. strigosellum</i>	0/10	6/10	5/10
Inoculação via plântula	Controle	0/10	0/10	0/10
	<i>Escovopsis</i> sp.	-	-	-
	<i>M. anisopliae</i>	0/10	0/10	0/10

<i>T. strigosellum</i>	0/10	0/10	9/10
------------------------	------	------	------

4.2 Características biométricas

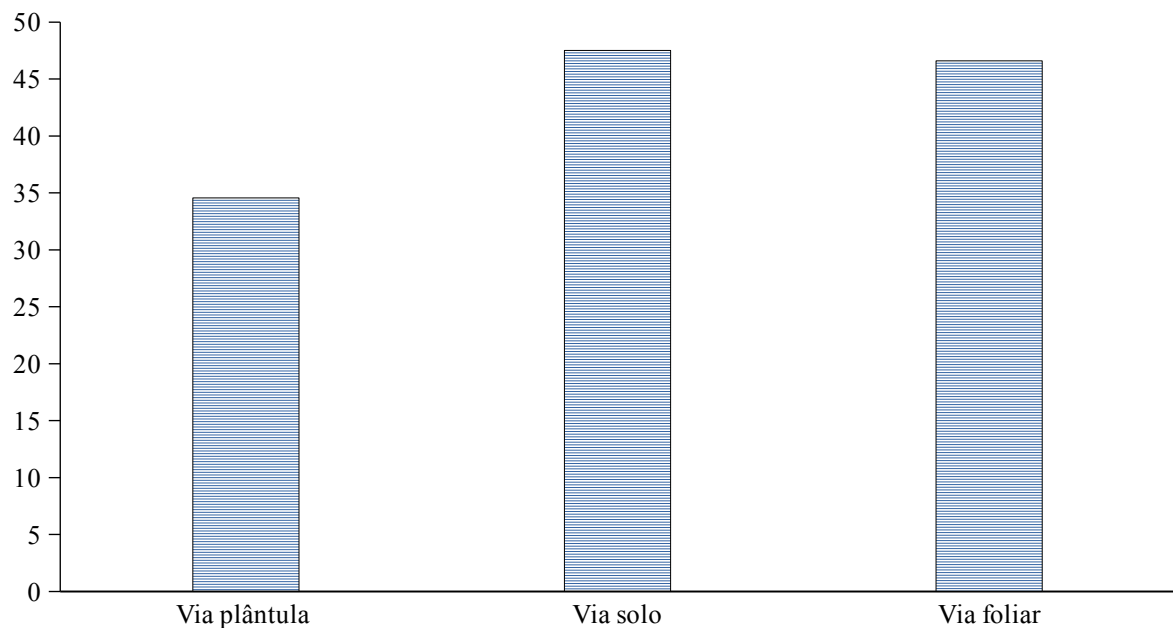
Tabela 4. Análise de variância de altura de plantas, número de folhas, massa seca da parte aérea, massa seca da raiz e massa seca total de *Eucalyptus urophylla*, em função de métodos de inoculação e fungos inoculados.

Altura de plantas					
FV ⁽¹⁾	GL	SQ	QM	F	P
Métodos de inoculação (M)	2	2091,43	1045,71	29,75	0,00 ^{*(2)}
Fungos inoculados (F)	3	3784,05	1261,35	35,88	0,00*
M x F	6	5319,50	886,58	25,22	0,00*
erro	48	1687,20	35,15		
Total corrigido	59	12882,18			
CV (%) = 13,83					
Média geral: 42,88			Número de observações: 60		
Número de folhas					
FV	GL	SQ	QM	F	P
Métodos de inoculação (M)	2	22,63	11,31	0,73	0,48 ^{ns}
Fungos inoculados (F)	3	594,85	198,28	12,87	0,00*
M x F	6	1307,90	217,98	14,15	0,00*
erro	48	739,20	15,40		
Total corrigido	59	2664,58			
CV (%) = 26,02					
Média geral: 15,08			Número de observações: 60		

Massa seca da parte aérea					
FV	GL	SQ	QM	F	P
Métodos de inoculação (M)	2	0,07	0,03	0,36	0,69 ^{ns}
Fungos inoculados (F)	3	2,56	0,85	8,32	0,00*
M x F	6	4,94	0,82	8,01	0,00*
erro	48	4,93	0,10		
Total corrigido	59	12,51			
CV (%) = 31,77					
Média geral: 1,00			Número de observações: 60		
Massa seca da raiz					
FV	GL	SQ	QM	F	P
Métodos de inoculação (M)	2	0,03	0,01	1,98	0,14 ^{ns}
Fungos inoculados (F)	3	0,04	0,01	1,58	0,20 ^{ns}
M x F	6	0,34	0,05	6,37	0,00*
erro	48	0,42	0,00		

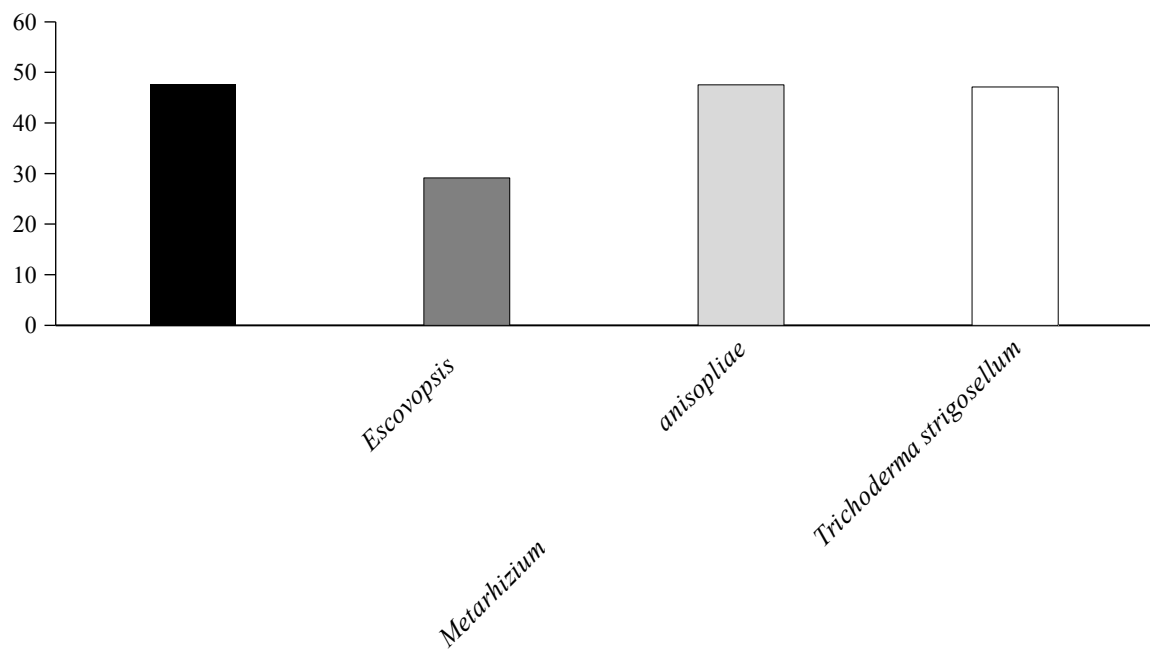
Total corrigido	59	0,84			
CV (%) = 41,34					
Média geral: 0,22	Número de observações: 60				
Massa seca total					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Métodos de inoculação (M)	2	0,19	0,09	0,65	0,52 ^{ns}
Fungos inoculados (F)	3	3,20	1,06	7,03	0,00*
M x F	6	7,60	1,26	8,33	0,00*
erro	48	7,29	0,15		
Total corrigido	59	18,31			
CV (%) = 31,50					
Média geral: 1,23	Número de observações: 60				

⁽¹⁾FV = fonte de variação; GL= grau de liberdade; SQ = soma do quadrado do erro; QM = quadrado médio; F = teste de significância ⁽²⁾; *significativo a 5% de probabilidade (P<0,05) ; ^{ns}: não significativo.



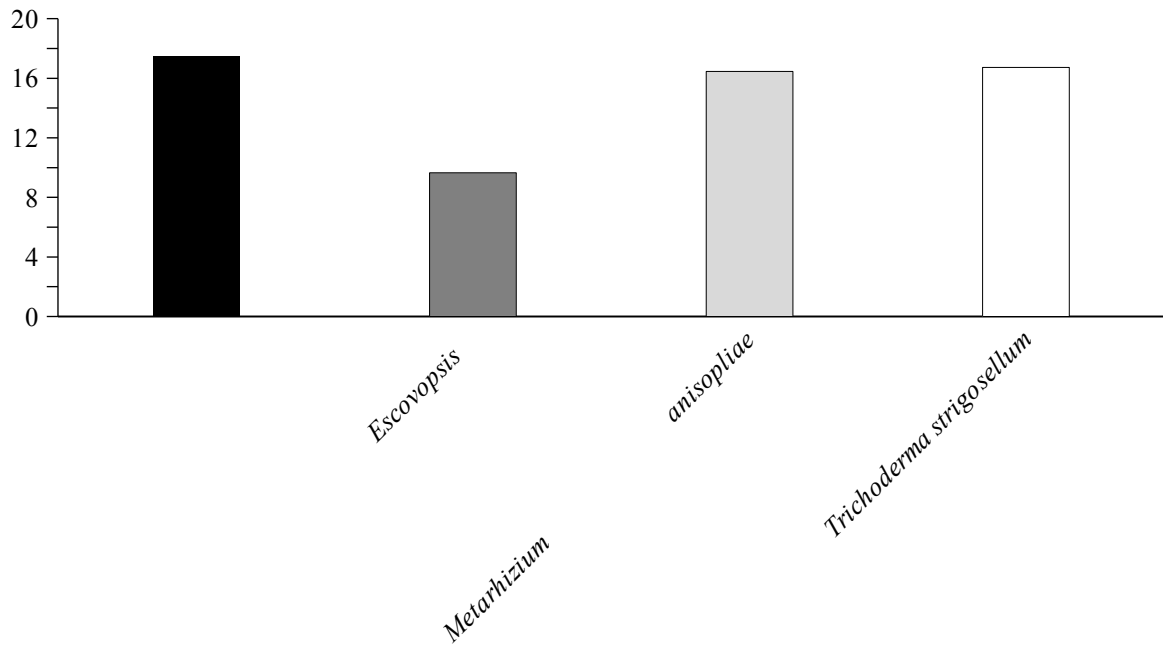
Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Figura 6 - Valores médios de altura de plantas (cm) de *Eucalyptus urophylla* tratadas com diferentes métodos de inoculação de fungos.



Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

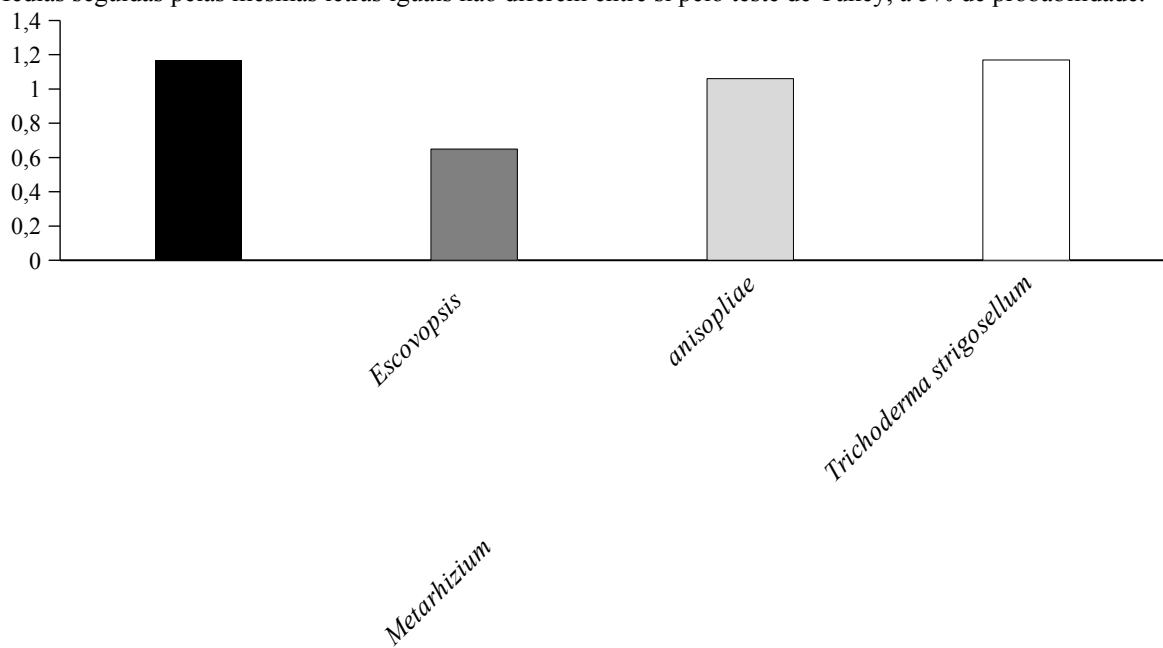
Figura 7 - Valores médios de altura de plantas (cm) de *Eucalyptus urophylla* tratadas com diferentes fungos.



Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

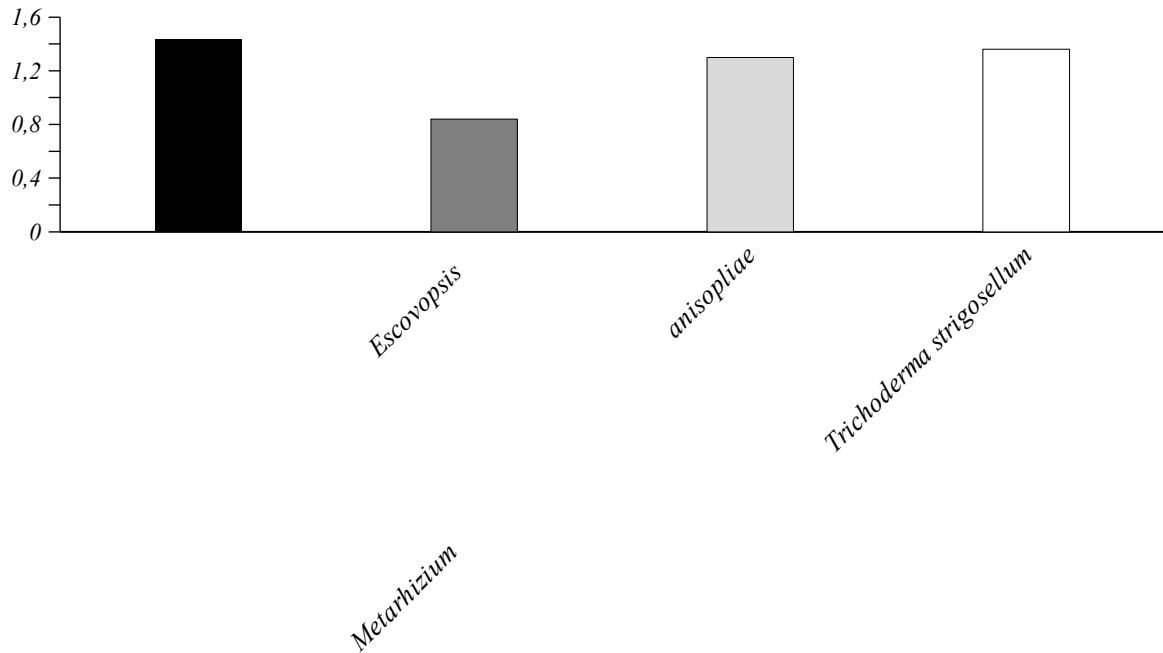
Figura 8 - Valores médios de número de folhas de plantas de *Eucalyptus urophylla* tratadas com diferentes fungos.

Médias seguidas pelas mesmas letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



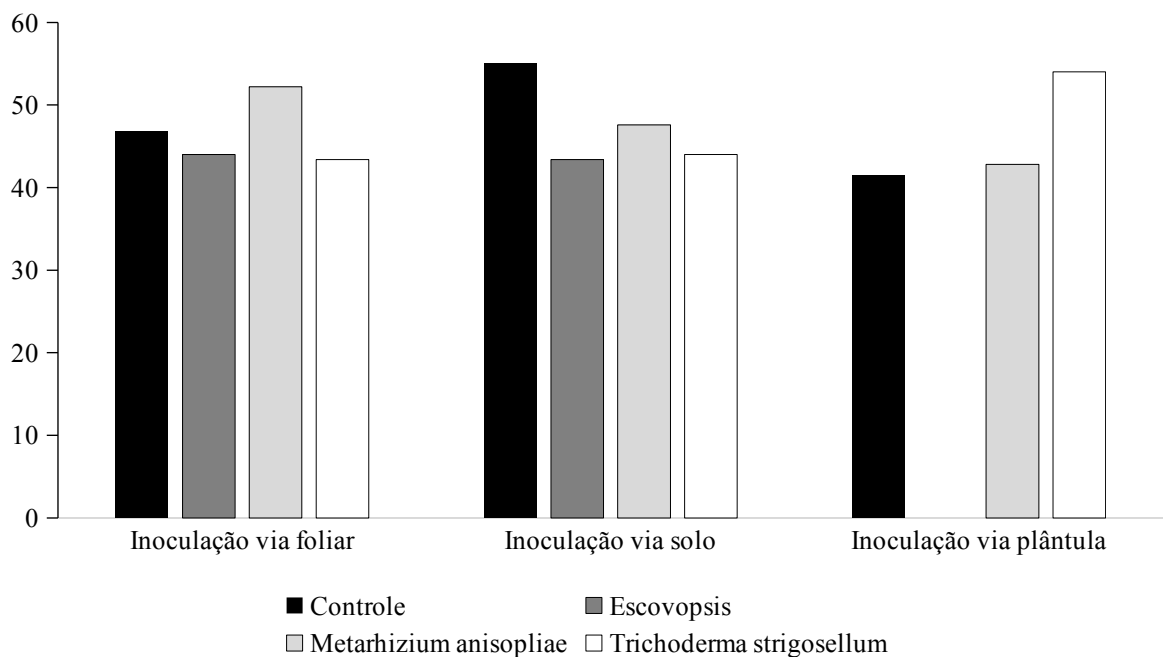
Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Figura 9 - Valores médios de massa seca da parte aérea (g) de plantas de *Eucalyptus urophylla* tratadas com diferentes fungos.



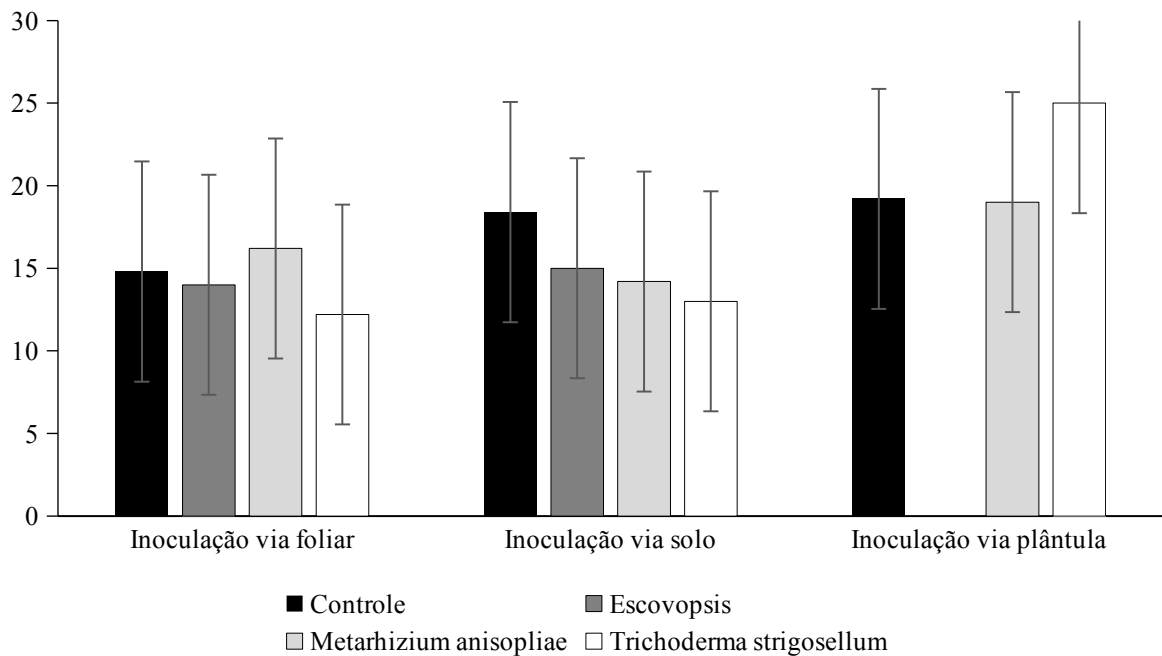
Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Figura 10 - Valores médios de massa seca total (g) de plantas de *Eucalyptus urophylla* tratadas com diferentes fungos.



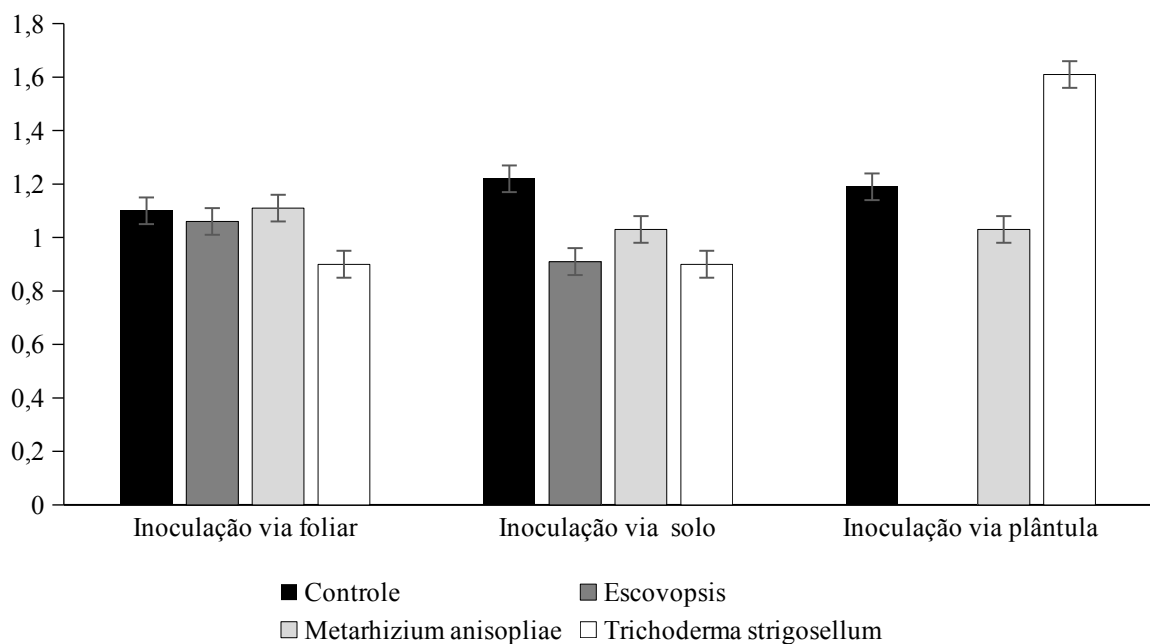
Médias seguidas da mesma letra maiúscula para efeito de fungos inoculados e minúscula para efeito de métodos de inoculação não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Cada coluna corresponde à média de altura de plantas para n= 5 plantas.

Figura 11 - Desdobramento da interação para médias altura de plantas (cm) de *Eucalyptus urophylla*, em função de diferentes métodos de inoculação e diferentes fungos inoculados.



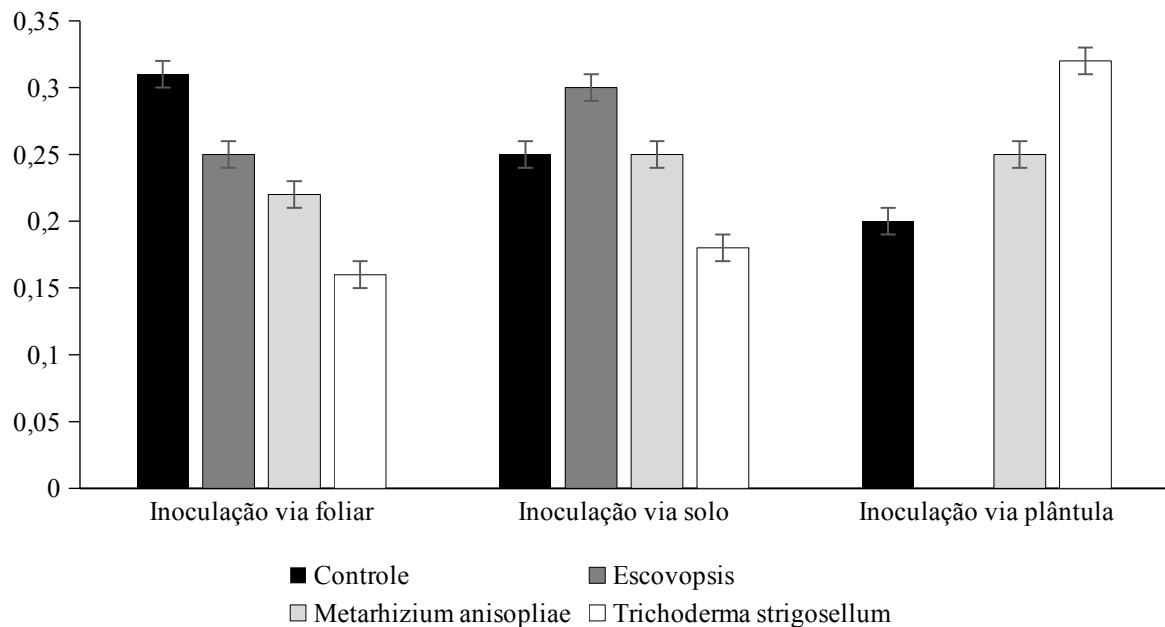
Médias seguidas da mesma letra maiúscula para efeito de fungos inoculados e minúscula para efeito de métodos de inoculação não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Cada coluna corresponde à média de número de folhas para n= 5 plantas.

Figura 12 - Desdobramento da interação para médias de número de folhas de plantas de *Eucalyptus urophylla*, em função de diferentes métodos de inoculação e diferentes fungos inoculados.



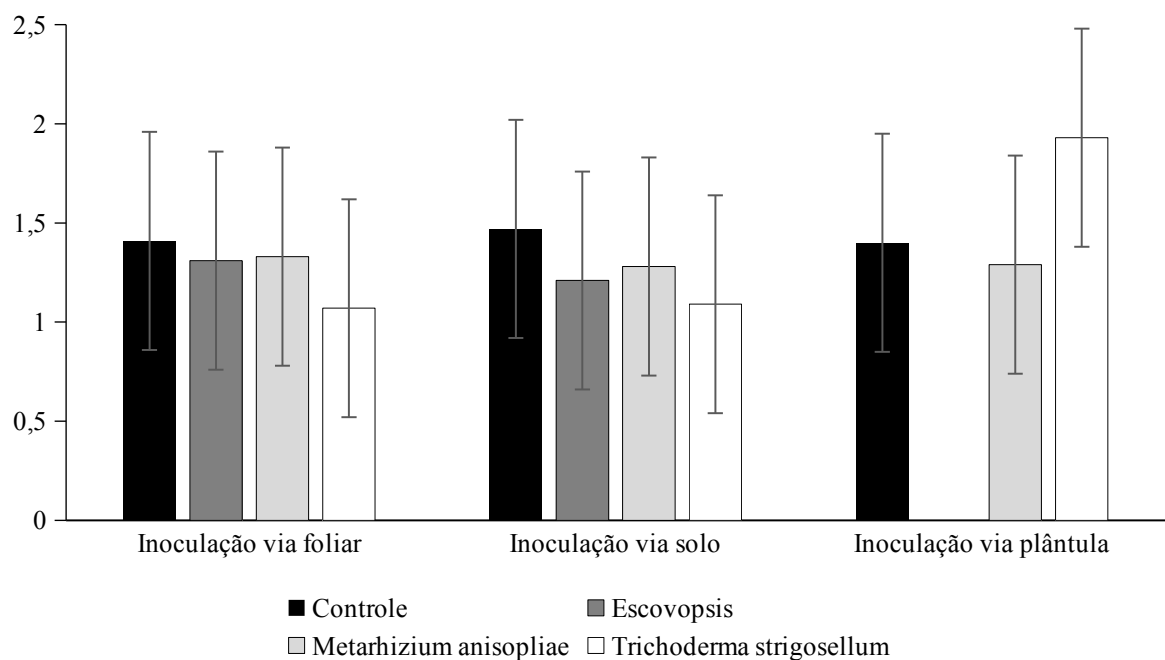
Médias seguidas da mesma letra maiúscula para efeito de fungos inoculados e minúscula para efeito de métodos de inoculação não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Cada coluna corresponde à média da parte aérea para n= 5 plantas.

Figura 13 - Desdobramento da interação para médias de massa seca da parte aérea (g) de plantas de *Eucalyptus urophylla*, em função de diferentes métodos de inoculação e diferentes fungos inoculados.



Médias seguidas da mesma letra maiúscula para efeito de fungos inoculados e minúscula para efeito de métodos de inoculação não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. A coluna corresponde à média de massa seca da raiz para n= 5 plantas.

Figura 14 - Desdobramento da interação para médias de massa seca da raiz (g) de plantas de *Eucalyptus urophylla*, em função de diferentes métodos de inoculação e diferentes fungos inoculados.



Médias seguidas da mesma letra maiúscula para efeito de fungos inoculados e minúscula para efeito de métodos de inoculação não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. A coluna corresponde à média de massa seca total para n= 5 plantas.

Figura 15 - Desdobramento da interação para médias de massa seca total (g) de plantas de eucalipto, em função de diferentes métodos de inoculação e diferentes fungos inoculados.

5 DISCUSSÃO

5.1 Colonização endofítica

O fungo *Trichoderma strigosellum* foi capaz de colonizar endofiticamente *Eucalyptus urophylla*, através do método de inoculação via solo e do método de inoculação via plântula (Figura 5). No método de inoculação via plântula, o fungo *T. strigosellum* foi isolado apenas nas raízes, colonizando um maior número de plantas (90%), quando comparado ao método de inoculação via solo, que colonizou as raízes de 50% das plantas tratadas (Tabela 2). No entanto, no método de inoculação via solo esse fungo colonizou também o caule, sendo encontrado esse padrão em 60% das plantas. Em nenhum dos métodos de inoculação estudado esse fungo foi encontrado na folha. Diferentemente do trabalho de BAILEY et al. (2006) que verificaram que as espécies *T. harzianum*, *T. hamatum* e *T. asperellum* colonizaram todos os órgãos da planta de cacau. PEREIRA (2012) verificou também que *T. harzianum*, quando inoculado nas sementes foi capaz de colonizar a raiz, o caule e a folha de maracujazeiro. Contudo, METCALF e WILSON (2001) ressaltam que a interação entre os fungos do gênero *Trichoderma* e a planta ocorre principalmente nas raízes, em diferentes níveis. CARVALHO FILHO et al. (2008) verificaram que os isolados CEN 162 (*T. asperellum*), CEN 262 (*T. harzianum*) e CEN 498 (*T. harzianum*) foram detectados somente nas raízes de mudas de clones híbrido de eucaliptos G-100 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*), após três aplicações, sendo uma no substrato e duas pulverizações nas partes aéreas. AZEVEDO et al. (2017) verificaram a presença de *T. virens* apenas na raiz, no tratamento de incorporação de grãos de arroz colonizados ao substrato e de miniestacas, em mudas clonais de *E. camaldulensis*. O fungo *T. strigosellum* foi encontrado na raiz e no caule, no método de inoculação via solo. PEREIRA (2012) detectou os fungos *T. harzianum*, *T. virens*, *T. longibrachiatum* na raiz e no caule para alguns tratamentos estudados.

As plantas de *E. urophylla* não foram colonizadas endofiticamente pelo isolado de *T. strigosellum* quando inoculado pelo método via foliar. Outros estudos também encontraram resultados semelhantes quando usado o mesmo método de inoculação. Como CARVALHO FILHO et al. (2008), com os isolados CEN 209 (*T. pseudokoningii*) e o CEN 500 (*T. harzianum*) inoculados em mudas híbridas de eucalipto. No estudo de PEREIRA (2012), a espécie *T. longibrachiatum* não foi observada em nenhuma parte da planta de maracujazeiro.

OWEN e HUNDLEY (2004) afirmam que interação entre planta e microrganismos endofíticos é complexa. Vários fatores podem influenciar nos resultados da colonização endofítica, como a planta escolhida para ser hospedeira, o método de inoculação do

microrganismo, o tipo e a fase do vegetal selecionado pra o isolamento, o procedimento de isolamento, número e quantidade de material isolado, além dos fatores bióticos e abióticos. (SIEBER, 2007). Vale ressaltar que alguns microrganismos endofíticos podem apresentar uma longa fase como epifítico, vivendo na superfície dos órgãos vegetais (PETRINI, 1991).

As plantas de *E. urophylla* não foram colonizadas endofiticamente pelos fungos *Escovopsis* sp. e *Metarhizium anisopliae*, em nenhum dos métodos de inoculação testados. Além disso, o fungo *Escovopsis* sp. no método de inoculação via plântula ocasionou a morte da plântulas. Mesmo após três tentativas, as plântulas não sobreviveram depois da inoculação.

No estudo de AKUTSE et al. (2013) os isolados ICIPE30 e S4ST7 de *M. anisopliae* não colonizaram endofiticamente *Vicia faba* (fava) e *Phaseolus vulgaris* (feijão comum). Diferindo dos resultados obtidos anteriormente por AKELLO (2012), onde o mesmo isolado S4ST7 de *M. anisopliae* colonizou endofiticamente plantas de milho, sorgo e capim napier. GÔLO (2014) relatou colonização endofítica em plantas de *Vigna unguiculata* (feijões cowpea) e *Cucumis sativus* (pepino) pelos fungos *M. robertsii* e *M. acridum*, após inoculação via sementes e a colonização endofítica de *M. brunneum* em *V. unguiculata* após aplicação foliar. No estudo de SASAN e BIDOCHKA (2012), o fungo *M. robertsii* colonizou endofiticamente *Panicum virgatum* e *P. vulgaris*. Desta maneira, fica evidenciado que a capacidade de colonização do fungo pode estar associada com a planta hospedeira, dependendo da espécie, bem como variedade e cultivar (AKUTSE, 2013).

Neste contexto, diversos trabalhos têm estudado óleos essenciais de plantas do gênero *Eucalyptus* sobre diversos microrganismos, devido suas propriedades microbianas (PEREIRA, 2010). Alguns trabalhos com ênfase nas propriedades antifúngicas dos óleos essenciais dessa cultura (BONALDO et al., 2007; DE LA CRUZ, 2002; DHALIWAL et al. 2004; FRIAS e KOZUSNY-ANDREANI, 2009; PIATI et al., 2011; RAMEZANI et al., 2002; VILELA, 2007). A atividade microbiana está relacionada com a ação de substâncias que fazem parte da sua composição, como os monoterpenos (GILLES et al., 2010). TRAORÉ et al. (2011) estudando a composição química de óleos essenciais de *E. urophylla*, encontrou em sua composição diversos monoterpenos, sendo os mais frequentes, respectivamente, p-cimeno, 1,8-cineol, γ -terpineno, α -pineno, carvacrol, entres outros. No estudo de SALGADO et al. (2003) o óleo de *E. urophylla* apresentou a maior ação fungitóxica, quando comparado com os óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. camaldulensis*. Segundo COLEY e BARONE (1996) nas folhas jovens há uma maior presença de substâncias antifúngicas, o que poderia ter influenciado também os resultados no método de inoculação via foliar.

Com isso, é importante conferir para cada condição de trabalho, a melhor espécie de fungo e da planta hospedeira, além do melhor método de inoculação, visando a obtenção de melhores resultados (PEREIRA, 2012).

5.2 Características biométricas

Constatou-se diferença estatística significativa entre os métodos de inoculação e os fungos inoculados para a variável altura de plantas (Tabela 3). Para as variáveis número de folhas, massa seca da parte aérea e massa seca total, o fator espécie de fungo inoculado diferiu significativamente. Quanto à variável massa seca da raiz, não houve diferença significativa para ambos fatores, indicando que embora os valores não sejam iguais, não podem ser considerados estatisticamente diferentes. O efeito da interação dos fatores métodos de inoculação x fungos inoculados foi estatisticamente diferente em todas as variáveis. Assim, o fator métodos de inoculação interferiu sob o fator fungos inoculados.

A altura de plantas foi menor no método de inoculação via plântula, quando comparados com os outros métodos (Figura 6). Dentre os fungos, as plantas inoculadas pelo fungo *Escovopsis* sp. diferiram das plantas controle e das plantas inoculadas pelos outros fungos, apresentando valores menores, tanto para altura da planta (Figura 7) e número de folhas (Figura 8), quanto para massa seca da parte aérea (Figura 9) e massa seca total (Figura 10).

No método de inoculação via solo, as plantas controle apresentaram-se mais altas quando comparadas as plantas controle do método de inoculação via plântula e as inoculadas pelos fungos *Escovopsis* sp. e *Trichoderma strigosellum* (Figura 11). Observou-se também maiores valores de altura nas plantas inoculadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*, no método de inoculação via foliar, em relação ao método de inoculação via plântula.

As plantas inoculadas com o fungo *T. strigosellum*, pelo método de inoculação via plântula, apresentaram valores maiores, quando comparadas com outros métodos, nas variáveis: altura de plantas; número de folhas (Figura 12), massa seca da parte aérea (Figura 13) e massa seca total (Figura 14). Na massa seca da raiz as plantas inoculadas pelo método de inoculação via plântula diferiram positivamente das plantas inoculadas via foliar (Figura 15). Houve incremento também na característica altura de plantas, quando comparada as plantas controle e as inoculadas pelos fungos *Escovopsis* sp. e *M. anisopliae*, e na variável massa seca da parte aérea, quando comparadas com as plantas inoculadas pelos outros fungos.

Quando inoculado via plântula, na característica altura de plantas, o fungo *T. strigosellum* promoveu um aumento na altura das mudas de eucalipto variando entre 19,62% e 18,52%, quando comparado ao método de inoculação via foliar e via solo, respectivamente. Na variável número de folhas, o aumento foi de 51,2% para inoculação via foliar e 48% para inoculação via solo. Em relação à massa seca da parte aérea, houve um incremento de 44,1% em comparação aos outros dois métodos. Na massa seca total, aumentou 44,56% e 43,53%, em comparação ao método inoculação via foliar e solo, respectivamente. Para massa seca da raiz, a diferença foi de 50% para o método via foliar. Resultados semelhantes foram obtidos por PEREIRA (2012), no método inoculação via sementes, onde o fungo *T. virens* incrementou a altura das mudas, a massa fresca da parte aérea e fresca total de maracujazeiro, diferindo do tratamento via inoculação foliar que não apresentou diferenças significativas em nenhuma característica estudada. Para as espécies *T. harzianum* e *T. longibrachiatum*, não foi observado diferença estatística entre os métodos de aplicação utilizados por PEREIRA (2012). PRATES et al. (2007) verificaram que os melhores resultados foram obtidos a partir da inoculação de *Trichoderma* spp. via substrato, em mudas cítricas.

As plantas inoculadas pelo fungo *Escovopsis* sp. também foram influenciadas pelo método de inoculação via plântula, porém, o efeito foi negativo, porque nesse método o fungo acarretou a morte das plântulas. Portanto, para o método de inoculação via plântula, as plantas inoculadas pelo *Escovopsis* sp. apresentou os menores valores em todas as variáveis, quando comparado aos outros métodos e também aos outros fungos inoculados.

O fungo *T. strigosellum* colonizou endofiticamente as plantas no método de inoculação via solo. Entretanto, não houve incremento em nenhuma das características avaliadas para essas plantas. Como no estudo de CARVALHO FILHO et al. (2008), o isolado CEN 500 - *T. harzianum* não promoveu resultados satisfatórios nas características biométricas avaliadas (massa seca da parte aérea, massa da raiz e altura de plantas) em mudas híbridas de eucalipto. LOHMANN et al. (2009), não obtiveram resultados positivos na massa fresca da parte aérea e massa seca das raízes no desenvolvimento de mudas de eucalipto, após aplicação de *T. harzianum*. No estudo de ROMÃO (2010), a espécie *T. virens* não gerou resultados promissores, o fungo foi incapaz de promover o crescimento de plantas de cana de açúcar. Resultados semelhantes foram encontrados por STOLF (2006), avaliando a influência do fungo endofítico *Trichoderma* spp. no crescimento de mudas de bananeira.

Segundo BENÍTEZ et al. (2004) e STEWART e HILL (2014), vários fatores, como o tipo de cultura e condições de desenvolvimento, são limitantes para desenvolvimento das plantas, o que torna os resultados altamente variáveis. De acordo com HARMAN et al.

(2004), obtém-se melhores resultados no desenvolvimento das plantas inoculadas por *Trichoderma*, quando as plantas estão em condições de estresse. ALTOMARE et al. (1999) verificaram que a capacidade do isolado T-22 de *T. harzianum*, na promoção de desenvolvimento de plantas, está diretamente ligada na aptidão desse fungo solubilizar nutrientes importantes para a planta. Outros mecanismos que aparentemente estão ligados à capacidade de espécies de *Trichoderma* promover o crescimento de plantas, são a produção de compostos que induz crescimento e controle de patógenos secundários, que são capazes de diminuir o crescimento e a atividade das raízes (BAKER, 1987).

5.3 Perspectivas

A partir dos resultados adquiridos pretende-se dar continuidade aos estudos obtendo mais plantas de *Eucalyptus urophylla* com o endófito *Trichoderma strigosellum*, para avaliar o comportamento e a mortalidade das formigas-cortadeiras com a presença desse fungo nos órgãos vegetais oferecidos para corte e posteriormente para a alimentação do fungo simbiote.

Devido aos vários fatores que podem interferir na relação fungos e plantas, como a planta hospedeira, pretende-se continuar os estudos com outras espécies e famílias de plantas visando a obtenção de melhores resultados.

6 CONCLUSÕES

O isolado *Trichoderma strigosellum* é capaz de colonizar endofiticamente *Eucalyptus urophylla*.

Não foi demonstrado que *Escovopsis* sp. e *Metarhizium anisopliae* colonizaram as plantas de *E. urophylla*.

O fungo *Escovopsis* sp. no método de inoculação via plântula ocasionou a morte das plântulas.

As plantas inoculadas com o fungo *T. strigosellum* apresentaram valores maiores para altura, pelo método de inoculação via plântula, quando comparadas com as plantas controle e as plantas inoculadas com os fungos *Escovopsis* sp. e *M. anisopliae*.

No método de inoculação via plântula, as plantas inoculadas com o fungo *T. strigosellum* apresentaram maiores valores, em relação aos métodos de inoculação via foliar e via solo, para as características biométricas estudadas: altura de plantas, número de folhas, massa seca da parte aérea e massa seca total.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTOMARE, C.; NORVELL, W. A.; BORKMAN, T.; HARMAN, G. E. Solubilization of phosphates and micronutrientes by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n.7, p. 2926-2933, 1999.

ALVES, S. B.; SOSA-GOMES, D. R. Virulência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. para duas castas de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908). **Poliagro**, v.5, n.1, p.1-9, 1983.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: Fealq, 1998. cap. 11, p. 289-381.

AKELLO, J., DUBOIS, T., GOLD, C.S., COYNE, D., NAKAVUMA, J. & PAPARU, P. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 96, n. 1, p. 34-42, 2007.

AKELLO, J. T. **Biodiversity of fungal endophytes associated with maize, sorghum and Napier grass and the influence of biopriming on the resistance to leaf mining, stem boring and sap sucking insect pests**. 2012. 137f. Thesis (Ecology and Development Series) - Faculty of Agriculture, University of Bonn, Cuvillier Verlag, Göttingen.

AKUTSE, K. S.; MANIANIA, N. K.; FIABOE, K. K. M.; BERG, J. V. D.; EKESI, S. Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on the life history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). **Fungal Ecology**, v. 6, n. 4, p. 293-301, 2013.

AMANTE, E. **Influência de alguns fatores microclimáticos sobre a formiga saúva *Atta laevigata* (F. Smith, 1858), *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, *Atta bisphaerica* Forel, 1908 e *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera, Formicidae), em formigueiros localizados no estado de São Paulo**. 1972. 175f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo.

ANJOS, N.; SANTOS, G. P.; ZANUNCIO, J. C. Resistência de *Eucalyptus* spp. à saúva-limão, *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 10, Rio de Janeiro, 1986. **Resumos**. Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1986. 404p.

ANTUNES, E. C.; DELLA LUCIA, T. M. C. Consumo foliar em *Eucalyptus urophylla* por *Acromyrmex laticeps nigrosetosus* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n. 1, p. 208-211, 1999.

AUGUSTIN, J. de O.; DIEHL, E.; SAMUELS, R. I.; ELLIOT, S. L. Fungos parasitas de formigas-cortadeiras e do seu fungo simbiote. In: DELLA -LUCIA, T. M. C. (Ed.) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2011. cap. 17, p. 262-283.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Ecologia Microbiana**. Ed. Embrapa, Jaguariúna, SP. 1998. p. 117-137.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W. J.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J. O. Microrganismos Endofíticos e seu Papel em Plantas Tropicais. In: AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L.A.; BARROS, N. M. (Eds.). **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria**. Caxias do Sul: Educs, 2002. p. 269-294.

AZEVEDO, G. B. de; NOVAES, Q. S. de; AZEVEDO, G. T. de O. S.; SILVA, H. F.; SOBRINHO, G. G. R.; NOVAES, A. B. de. Efeito de *Trichoderma* spp. no crescimento de mudas clonais de *Eucalyptus camaldulensis*. **Scientia Forestalis**, v. 45, n. 114, p. 343-352, 2017.

BACON, C. C. W.; WHITE, J. F. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. In: BACON, C. J.; WHITE, J. F. (Ed.). **Microbial endophytes**. New York: Macel Dekker, 2000.

BAILEY, B.; BAE, H.; STREM, M.; ROBERTS, D.; THOMAS, S.; CROZIER, J.; SAMUELS, G.; CHOI, I.; HOLMES, K. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. **Planta**, v. 224, n. 6, p. 1149-1164, 2006.

BAKER, R.; AHMAD, J. S. Rhizosphere Competence of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 77, n. 21, p. 182-189, 1987.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C. L.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p.249-260, 2004.

BERTI FILHO, E.; MACEDO, L. P. M. **Fundamentos de controle biológico de insetos-praga**. Natal: IFRN Editora, 2011. 180p.

BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica**, Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), Piracicaba, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997.

BOLTON, B. Synopsis and classification of Formicidae. **Memoirs of the American Entomological Institute**, v. 71, n. 1, p. 1-370, 2003.

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R; CRUZ, M. E. S.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 4, p. 383-387, 2007.

BRANDÃO, C. R. F.; CANCELLO, E. M. Invertebrados terrestres. In: JOLY, C. A.; BICUDO, C. E. M. (Ed.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo: síntese do conhecimento ao final do século XX**. São Paulo: Fapesp, 1999. v. 5, 279p.

BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A.J.; SANHUDO, C. E. D. Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da Bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG, 2011. cap. 2, p. 27-48.

BURATTO, D. A.; CARDOSO, J. T.; ROLIM, F. A.; FILHO, W. R. Avaliação dos danos causados por formigas-cortadeiras do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera) aos plantios de *Pinus taeda* no planalto sul-catarinense. **Floresta**, v. 42, n. 4, p. 683-690, 2012.

CABRAL, D.; STONE, J. K.; CARROLL, G. C. The internal mycobiota of *Juncus* spp.: microscopic and cultural observations of infection patterns. **Mycological Research**, v. 97, n. 3, p. 367-376, 1993.

CANTARELLI, E. B.; COSTA, E. C.; PEZZUTTI, R.; OLIVEIRA, L. DA S. Quantificação das perdas no desenvolvimento de *Pinus taeda* após o ataque de formigas cortadeiras. **Ciência Florestal**, v. 18, n. 1, p. 39-45, 2008.

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. JR.; LACHANCE, M. A.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J.; RUIVO, C. C. C.; ROSA, C. A. *Symptodiomyces attinorum* sp. nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1891-1894, 2004.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, n. 1, p. 2-9, 1988.

CARVALHO FILHO, M. R.; MELLO, S. C. M.; SANTOS, R. P.; MENÊZES, J. E. Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético in vitro e colonização endofítica de mudas de eucalipto. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Embrapa Recursos Genéticos Biotecnologia, Brasília, n. 226, 16p. 2008.

CHAPELA, I. H.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R.; MUELLER, U. G. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, v. 266, n. 5191, 1691p. 1994.

CHERRETT, J. M. The economic importance and control of leafcutting ants. In: VINSON, S. B. (Ed.). **Economic impact and control of social insects**. Praeger Publishers, New York, 1986. p. 165-192.

CIB. Conselho de Informações sobre Biotecnologia. Guia do eucalipto: oportunidade para um desenvolvimento sustentável. 2008. Disponível em: <http://cib.org.br/wp-content/uploads/2011/10/Guia_do_Eucalipto_junho_2008.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2017.

CLAY, K. Clavicipitaceous fungal endophytes of grasses: coevolution and the change from parasitism to mutualism. In: PIROZYNSKI, K. A.; HAWKSWORTH, D. L. (Eds.). **Coevolution of fungi with plants and animals**. Academic Press, New York, 1988. p. 79-105.

CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. **American Naturalist**, v. 160, n. 1, p. 99-127, 2002.

COBLENTZ, K.; VAN BAEL, S. A. Field colonies of leaf-cutting ants select plant materials containing low abundances of endophytic fungi. **Ecosphere**, v. 4, n. 5, p. 1-10, 2013.

COLEY, P. D., BARONE J. A. Herbivory and plant defenses in tropical forests. **Annual Reviews Ecology Systematic**, v. 27, n. 1, p. 305-335, 1996.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 14, p. 7998-8002, 1999.

CURRIE, C. R. A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Review Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 357-380, 2001.

CURRIE, C. R. Ants, agriculture, and antibiotics: a quadripartite symbiosis. In: SECKBACH, J. (Ed.). **Symbiosis: mechanisms and model system**. Kluwer Academic Publishers. 2002. p. 687-699.

CURRIE, C.R.; SCOTT, J.A.; SUMMERBELL, R.C.; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, v. 423, n. 1, p. 461, 2003.

DE BARY, A. Morphologie Physiologie der Pilze, Flechten, und Myxomyceten. Leipzig: W. Engelmann, **Handbuch der Physiologischen Botanik**, 1866. 316p.

DELABIE, J. H. C.; ALVES, H. S. R.; REUSS-STRENZEL, G. M.; CARMO, A. F. R.; NASCIMENTO, I. C. Distribuição das formigas-cordadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* no Novo Mundo. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo**. Viçosa-MG: UFV, 2011. cap. 5, p. 80-101.

DELLA LUCIA, T.M.C.; VILELA, E. F. Métodos atuais de controle e perspectiva. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa-MG: Ed. Folha de Viçosa, 1993, cap. 12, p.163-176.

DELLA LUCIA, T. M. C.; OLIVEIRA, M. A.; ARAÚJO, M. S.; VILELA, E. F. Avaliação da não-preferência da formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel ao corte de *Eucalyptus*. Revista *Árvore*, Viçosa, v. 19, n. 1, p. 92-99, 1995.

DELLA LUCIA, T. M. C.; SOUZA, D. J. Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da Bioecologia ao manejo**. Viçosa-MG: Ed. UFV, 2011. cap. 1, p. 13-26.

DIAS, B. A. **Estudo de proteases degradadoras de cutícula produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana***. 2005. 70f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

DHALIWAL, H. J. S.; THIND, T. S.; CHANDER, M. Relative activity of essential oils from plants against *Penicillium digitatum* causing post-harvest fruit rot of Kinnow mandarin. **Plant Disease Research**, v. 19, n. 1, p. 140-143, 2004.

DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E. **Patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a formiga saúva *Atta sexdens piperiventris***. Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico, n. 6, 15p. 1986.

DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E.; PACHECO, M. R. M. Testes de patogenicidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Atta sexdens periventris* (Santschi, 1919) em diferentes temperaturas. **Ciência e Cultura**, v. 40, n. 11, p. 1103-1105, 1988.

DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E.; VALIM-LABRES, M. E.; SPECHT, A. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. no Rio Grande do Sul. **Acta Biologica Leopoldensia**, v. 14, n. 1, p. 99-104, 1992.

ESTRADA, C.; WCISLO, W. T.; VAN BAEL, S. Symbiotic fungi alter plant chemistry that discourages leaf-cutting ants. **New Phytologist**, v. 198, n. 1, p. 241-251, 2013.

FAETH, S. H.; FAGAN, W. F. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 1, p. 360-368, 2002.

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

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FERNANDEZ, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, n. 6, 128p. 1993.

FILHO, A. B.; ALMEIDA, J. E. M.; SANTOS, A. S.; MACHADO, L. A.; ALVES, S. B. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: Cercopidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 3, 309-314, 2003.

FISHER, P. J.; STRADLING, D. J.; SUTTON, B. C.; PETRINI, L. E. Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. **Mycological Research**, v. 100, n. 5, 541-546, 1996.

FOLGARAIT, P.; GOROSITO, N.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf cutting ants as biocontrol agents. **Current microbiology**, v. 63, n. 3, p. 250-258, 2011.

FREITAS, S.; BERTI, E. F. Efeito do desfolhamento na crescimento de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden (Myrtaceae). **Circular Técnica**, Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), Piracicaba, n. 47, p. 36-43, 1994.

FRIAS, D. F. R.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de extratos de plantas e óleo de eucalipto sobre *Trichophyton mentagrophytes*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 2, p. 216-220, 2009.

FRAZZON, A. P.; VAZ, I. S.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 1, p. 117-125, 2000.

GAO, F.; DAI, C.; LIU, X. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 13, p. 1346-1351, 2010.

GILLES, M.; ZHAO, J.; A. N., M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 731-737, 2010.

GÔLO, P. S. **Metarhizium spp.: caracterização de isolados com potencial para biocontrole de pragas**. 2014. 133f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

GOMES, U. D.; ORLANDELLI, R. C.; SANTOS, M. S.; POLONIO, J. C.; PAMPHILE, J. A.;

RUBIN FILHO, C. J. Avaliação do desenvolvimento de plantas de milho (*Zea mays* L.) após colonização pelo fungo endofítico *Fusarium verticillioides*. **CESUMAR**, v. 15, n. 2, p. 131-137, 2013.

HAMAYUN, M.; KHAN, S. A.; IQBAL, I.; AHMAD, B., LEE, I. J. Isolation of a gibberellin-producing fungus (*Penicillium* sp. MH7) and growth promotion of Crown daisy (*Chrysanthemum coronarium*). **Journal of Microbial Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 202-207, 2010.

HANADA, R. E.; JORGE SOUZA, T.; POMELLA, A. W. V.; HEBBAR, K. P.; PEREIRA, J. O.; ISMAIEL, A.; SAMUELS, G. J. *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. **Mycological Research**, v. 112, n. 1, p. 1335-1343, 2008.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, n. 1, p. 377-393, 2000.

HARMAN, G. E. HOWELL, C. R.; VITEBERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature**, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.

HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Derivados de plantas tóxicas como alternativa potencial para o controle de formigas cortadeiras. **Anais do III, Curso de Atualização no Controle de Formigas Cortadeiras**. PCMIP/IPEF, p. 8-10, 1994.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Harvard University. Press, Cambridge, 1990. 732p.

HUGHES, W. O. H.; THOMSEN, L.; EILENBERG, J.; BOOMSMA, J. J. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting and nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, n. 1, p. 46-53, 2004.

HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, v. 33, n. 1, p. 163-173, 2008.

IBÁ. INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Relatório anual**, Brasília, 2017. 80p.

JACCOUD, D. B.; HUGHES, W.O.H.; JACKSON, C. W. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 93, n. 1, p. 51-61, 1999.

MARSARO JUNIOR, A. L.; MOLINA-RUGAMA, A. J.; LIMA, C. A.; DELLA LUCIA, T. M. C. Preferência de corte de *Eucalyptus* spp. por *Acromyrmex laticeps nigrosetosus* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) em condições de laboratório. **Ciência Florestal**, v. 17, n. 2, p. 171-174, 2007.

KHAN, A. L.; HAMAYUN, M.; KANG, S. M.; KIM, Y. H.; JUNG, H. Y.; LEE, J. H.; LEE, I. J. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 1-14, 2012.

KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite - what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 4, p. 358-363, 2006.

KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T. S. Endophyte assemblages in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation. **Fungal Diversity**, v. 9, n. 1, p. 81-91, 2002.

LEITE, L. G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; ALVES, S. B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto, A.S. Pinto, 92p. 2003.

LITTLEDYKE, M.; CHERRETT, J. M. Direct ingestion of plants sap from cut leaves by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 66, n. 2, p. 205-217, 1976.

LOECK, A. E.; GRUTZMACHER, D. D.; STORCH, G. Distribuição geográfica de *Atta sexdens piriventris* Santschi, 1919, nas principais regiões agropecuárias do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 7, n. 1, p. 54-57, 2001.

LOHMANN, T. D.; MASCARIN, G. M. Efeito da aplicação de *Trichoderma harzianum* na supressão de doenças e no desenvolvimento de mudas de eucalipto. Resumo do VI. CBA e II CLAA. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4, n. 2, p. 1256-1259, 2009.

LOPEZ, E.; ORDUZ, S. *Metarhizium anisoplae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. **Biological Control**. v.27, n.2, p.194-200, 2003.

LOUREIRO, E. S.; MONTEIRO, A. C. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisoplae* e *Paecilomyces farinosus*, patogênicos para operarias de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, n. 1, p.35-40, 2004.

LUCIANO, H. M.; DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E. Organismos associados a uma colônia de *Acromyrmex heyeri* (Hymenoptera: Formicidae) mantida em laboratório. **Acta Biologica Leopoldensia**, v. 17, n. 2, p. 47-56, 1995.

- MARCELINO, J.; GIORDANO, R.; GOULI, S.; GOULI, V.; PARKER, B. L.; SKINNER, M.; TEBEEST, D.; CESNIK, R. *Colletotrichum acutatum* var. *fioriniae* (teleomorph: *Glomerella acutata* var. *fioriniae* var. nov.) infection of a scale insect. **Mycologia**, v. 100, n. 3, 353-374, 2008.
- MARINHO, C. G. S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; PICANÇO, M. C. Fatores que dificultam o controle das formigas cortadeiras. **Bahia Agrícola**, v. 7, n. 2, p. 18-21, 2006.
- MEHDIABADI, N.J.; HUGHES, B.; MULLER, U.G. Cooperatin, conflict, and coevolution in the attine ant-fungus symbiosis. **Behavioral Ecology**, v.17, n.2, p. 291-296, 2006.
- MEISTER, B.; KRAUSS, J.; HARRI, S. A.; SCHNEIDER, M. V.; MULLER, C. B. Fungal endosymbionts affect aphid population size by reduction of adult life span and fecundity. **Basic and Applied Ecology**, v. 7, n. 1, p. 244-252, 2006.
- MENDES FILHO, J.M.A. Ação danosa de pragas desfolhadoras sobre as florestas de *Eucalyptus*. **Circular Técnica**, ESALQ/USP, Piracicaba, n. 131, p.1-6, 1981.
- METCALF, D. A.; WILSON, C. R, T. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. **Plant Pathology**, v. 50, n. 2, p. 249-257, 2001.
- MILLER, J. D.; MACKENZIE, S.; FOTO, M.; ADAMS, G. W.; FINDLAY, J. A. Needles of white spruce inoculated with rugulosin-producing endophytes contain rugulosin reducing spruce budworm growth rate. **Mycological Research**, v. 106, n. 4, p. 471-479, 2002.
- MÖLLER, A. Die Pilzgärten einiger südamerikanischer Ameisen. **Botanische Mitteilungen aus den Tropen**, v. 6, n. 1, p. 1-27, 1893.
- MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International of Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 1-4, 2001.
- MOREIRA, D. D. O.; ERTHAL JR., M.; SAMUELS, R. I. Alimentação e digestão em formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M. C. (Ed.). **Formigas-Cortadeiras da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Ed. UFV. 2011. cap. 11, p. 204-225.
- MUCHOVEJ, J. J.; DELLA-LUCIA, T. M. C. *Escovopsis*, a new genus from leaf-cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomem invalidum. **Mycotaxon**, v. 37, n. 1, p. 191-195, 1990.
- MÜLLER, C. B.; KRAUSS, J. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 450-456, 2005.
- NASCIMENTO, R. R. D.; SCHOETERS, E.; MORGAN, E. D.; BILLEN, J.; STRADLING, D. J. Chemistry of metapleural gland secretions of there attine ants, *Atta sexdens* rubropilosa, *Atta cephalotes* and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera:Formicidae). **Journal of Chemical Ecology**, v.22, n.5, p.987-1000, 1996.
- OLIVEIRA, M. A; ARAÚJO, M. S.; MARINHO, C. G. S.; RIBEIRO, M. M. R.; DELLA LUCIA, T. M. C. Manejo de formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.).

Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo. Viçosa-MG: UFV, 2011. cap. 23, p. 400-419.

ORTIZ, A.; ORDUZ, S. *In vitro* evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Mycopathologia**, v. 150, n. 2, p. 53-60, 2001.

OSSES, R.; VALENZUELA, S.; FREER, J.; SANFUENTES, E.; RODRIGUEZ, J. Fungal endophytes in xylem of healthy chilean trees and their possible role in early wood decay. **Fungal Diversity**, v. 33, n. 1, p. 77-86, 2008.

OWEN, N. L.; HUNDLEY, N. Endophytes - the chemical synthesizers inside plants. **Science Progress**, v. 87, n. 2, p. 79-99, 2004.

OWNLEY, B. H.; GRIFFIN, M. R.; KLINGEMAN, W. E.; GWINN, K. D.; MOULTON, J. K.; PEREIRA, R. M. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 3, p. 267-270, 2008.

PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; JR. BACCI, M. Microorganismos associados às formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo.** Viçosa: Editora da UFV, 2011. cap. 16, p. 262-283.

PARSA, S.; ORTIZ, V.; VEGA, F. E. Establishing Fungal Entomopathogens as Endophytes Towards Endophytic Biological Control. **Journal of Visualized Experiments**, v. 74, n. 1, p. 1-5, 2013.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microorganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 5, n. 29, p. 62-77, 2002.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microorganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

PEREIRA, G. V. N. **Promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro inoculadas com *Trichoderma* spp.** 2012. 68f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia.

PEREIRA, J. L. **Composição química dos óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus* L' Herit (Myrtaceae).** 2010. 69f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

PEREIRA, L. G. B. Estratégias de controle de formigas cortadeiras. **Dossiê técnico**, Centro de Formação Técnica e Profissional (CETEC), Belo Horizonte, 21p. 2007.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves.** Springer-Verlag, New York, 1991. p. 179-197.

PIATI, A.; SCHNEIDER, C. F.; NOZAKI, M. de H. Efeito in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre o crescimento e desenvolvimento de *Penicillium* sp. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 3, p. 1033-1040, 2011.

PRATES, H. S.; JUNIOR, J. L.; ROSSI, M. L. Composição mineral de mudas cítricas com aplicação de *Trichoderma* spp. **Informações Agronômicas**, n. 18, p. 4-5, 2007.

RAMEZANI, H.; SINGH, H. P.; BATISH, D. R. A.; KOHLI, R. K. Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus critriodora*. **Fitoterapia**, v. 73, n. 3, p. 261-262, 2002.

REYNOLDS, H. T.; CURRIE, C. R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. **Mycologia**, v. 96, n. 5, p. 955-959, 2004.

RIBEIRO, M. M. R.; MARINHO, C. G. S. Seleção e forrageamento em formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) **Formigas-cortadeiras: da Bioecologia ao manejo**. Viçosa-MG, 2011. cap. 11, p. 189-203.

Ribeiro M. M. R., Amaral K. D., Seide V. E., Souza B. M. R., Della Lucia T. M. C., Kasuya M. C. M. de Souza D. J. Diversity of fungi associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): the activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. **Psyche: A Journal of Entomology**, v. 2012, n. 1, p. 1-6, 2012.

ROBERTS, D. W.; ST LEGER, R. J. Metarhizium spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. **Advances in Applied Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 1-70, 2004.

ROCHA, S. L.; JORGE, V. L., DELLA LUCIA, T. M. C.; BARRETO, R. W.; EVANS, H. C.; ELLIOT, S. L. Quality control by leaf-cutting ants: evidence from communities of endophytic fungi in foraged and rejected vegetation. **Arthropod-Plant Interactions**. v. 8, n. 1, p. 485-493, 2014.

ROCHA, S. L.; EVANS, H. C.; JORGE, V. L.; CARDOSO, L. A. O.; PEREIRA, F. S. T.; ROCHA, F. B., BARRETO, R. W.; HART, A. G.; ELLIOT, S. L. Recognition of endophytic *Trichoderma* species by leaf-cutting ants and their potential in a Trojan-horse management strategy. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2017.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; PLENNIG, L. H.; BACCI JR. M. Assessment of microfungi in fungus gardens free of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 46, n. 2, p. 329-334, 2005.

RODRIGUES, A.; BACCI, M. JR.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal “Weeds” in the Leafcutter Ant Symbiosis. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 4, p. 604-614, 2008.

ROMÃO, A. S. **Análise da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar e estudo da interação *Trichoderma virens*-planta hospedeira**. 2010. 268f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo.

SANTANA, D. L. de Q.; ANJOS, N. dos. Resistência de *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae) à *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta laevigata*. **Revista Árvore**, v. 13, n. 2, p. 174-181, 1999.

- SANTOS, A. V.; DILLON, R. J.; DILLON, V. M.; REYNOLDS, S. E.; SAMUELS, R. I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* rubropilosa. **FEMS Microbiol Letters**, v. 239, n. 2, p. 319-323, 2004.
- SANTOS, G. P.; ZANUNCIO, J. C.; ZANUNCIO, T. V.; PIRES, E. M. Pragas do eucalipto. **Informe Agropecuário**, v. 29, n. 242, p. 43-64, 2008.
- SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 195-206, 2006.
- SASAN, R. K.; BIDOCHKA, M. J. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 1, p. 101-107, 2012.
- SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M. J. Symbiosis of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 315-340, 2004.
- SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1267-1274, 2010.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycology Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.
- SCHULZ, B.; SUCKER, J.; AUST, H. J.; KROHN, K.; LUDEWIG, K.; JONES, P. G.; DORING, D. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. **Mycological Research**, v. 99, p. 1007-1015, 1995.
- SIEBER, T. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 75-89, 2007.
- SILVA, A., BACCI, M., PAGNOCCA, F. C., BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Microbiological research**, v. 161, n. 4, p. 299-303, 2006.
- SIVIERO, A. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* x *Poncirus trifoliata* à gomose. 2001. 114 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.
- SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L., ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L., SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.
- SPECHT, A.; DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E. Atratividade de iscas de *B. bassiana* (Bals) Vuill. a formiga do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 23, n. 1, p. 99-104, 1994.

STEWART, A.; HILL, R. Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion. In: GUPTA, V. K.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; UPADHYAY, R. S.; DRUZHININA, I.; TUOHY, M. G. (Eds.). **Biotechnology and biology of *Trichoderma***. Boston: Elsevier USA, 2014. p. 415-428.

STOLF, E. C. **Efeito de re-inoculações de fungos endofíticos sobre o controle do nematóide cavernícola da bananeira (*Radopholus similis*)**. 2006. 50f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Santa Catarina, Turrialba.

VAN BAEL, S. A.; FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; VALENCIA, M. C.; ROJAS E. I.; WCISLO, W. T., HERRE, E. A. Two fungal symbioses collide: endophytic fungi are not welcome in leaf-cutting ant gardens. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, v. 276, n. 1, p. 2419-2426, 2009.

VASCONCELOS, H. L.; CHERRETT, J. M. Leaf-cutting ants and early forest regeneration in central Amazonia: effects of herbivory on tree seedling establishment. **Journal of Tropical Ecology**, v. 13, n.3, p. 357-370, 1997.

VILELA, G. **Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre espécies produtoras de aflotoxinas**. 2007. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 64p. 2007.

WEBER, N. A. The Attines: the fungus-culturing ants. **American Scientist**, v. 60, n. 4, p. 448-456, 1972.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; MAYHÉ-NUNES, A. J.; MEDEIROS, A. G. B.; SILVA, A. S. Combate Sistemático de formigas-cortadeiras com iscas granuladas, em eucaliptais com cultivo mínimo. **Revista Árvore**, v. 27, n. 3, p. 387-392, 2003.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 879-920, 2007.