

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO ENDOFITICA DE *TRICHODERMA STRIGOSELLUM* EM *EUCALYPTUS UROPHYLLA*

Lorrayne Martins da Silva¹; Laila Sirino de Araújo²; Dayara Vieira Silva³; Danival José de Souza⁴

- (¹) Graduanda em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Tocantins, Chácara 69-72- Rua Badejos, Lote 7, s/n - 77404-970, Gurupi - TO, Brasil.
- (²) Graduanda em Engenharia Agrônômica, Universidade Federal do Tocantins, Chácara 69-72- Rua Badejos, Lote 7, s/n - 77404-970, Gurupi - TO, Brasil.
- (³) Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Produção vegetal na Universidade Federal do Tocantins, Chácara 69-72- Rua Badejos, Lote 7, s/n - 77404-970, Gurupi - TO, Brasil.
- (⁴) Orientador, Docente do curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Tocantins, Chácara 69-72 - Rua Badejos, Lote 7, s/n - 77404-970, Gurupi - TO, Brasil.

Martins.lorrayne@outlook.com, Sirino.laila@gmail.com, Dayaravieira@hotmail.com, Danival@uft.edu.br

Identificação do evento: Apresentado no IV Congresso Brasileiro de Eucalipto – 07 e 08 de Agosto de 2019 - Auditório da Federação das Indústrias do Estado da Bahia – FIE – Salvador – BA

RESUMO: Diversos estudos evidenciam o potencial endofítico de alguns fungos para controle fitopatogênicos, tornando-se uma possível estratégia de manejo dentro do ecossistema florestal. A escassez de alternativas que possibilitam um controle de pragas florestais contribuiu para a realização deste trabalho que teve como objetivo avaliar o potencial de colonização endofítica de *Eucalyptus urophylla* por *Trichoderma strigosellum*. O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado, usando esquema fatorial 2x3, com 10 repetições, sendo cada parcela constituída por uma muda. Os fatores utilizados foram uma espécie de fungo e um controle e três métodos de inoculação (via foliar, via solo e via plântula). Para o método de inoculação via plântula, foi reisolado *T. strigosellum* apenas nas raízes, obtendo maiores valores quando comparado com os outros métodos. Já no método de inoculação via solo, foi possível encontrar o isolado fungico tanto na raiz quanto no caule. As mudas de *E. urophylla* não foram colonizadas endofiticamente quando inoculadas via foliar. Desse modo, foi possível constatar que houve resultados positivos no desenvolvimento da planta, quando utilizado métodos de inoculação via plântula, que possibilitou a colonização endofítica da mesma.

Palavra-chave: *Colonização endofítica, controle biológico, antagonismo.*

INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Eucalyptus* se destacam no Brasil por representar cerca de 72% de área de floresta plantada (IBÁ, 2017), *E. urophylla* é a espécie mais cultivada no país (CIB, 2008). Classificadas como as principais pragas desfolhadoras nessas florestas, as formigas-cortadeiras do gênero *Atta* Fabricius e *Acromyrmex* Mayr (ZANETTI et al., 2003) são intituladas devido aos constantes danos e prejuízos causados nas plantações de eucalipto (BURATTO et al., 2012), tais danos são resultantes dos contínuos cortes de material vegetal fresco utilizados como substratos para nutrir e cultivar os fungos simbiotes mutualistas *Leucoagaricus gongylophorus*.

Além desta interação, as formigas-cortadeiras interagem com vários outros microrganismos dentre eles fungos parasitas e antagonistas, como é o caso de *Trichoderma* sp., (RODRIGUES, 2008). Os fungos endofíticos povoam e propagam-se no interior de partes vegetativas das plantas sem aparentemente causar danos aos tecidos vegetais vivos (AZEVEDO, 1998). Segundo AZEVEDO et al. (2002) o hospedeiro pode ser beneficiado com a colonização do fungo endofítico pela a produção de compostos que promovem o crescimento vegetal e atuam contra outros microrganismos e animais herbívoros. Deste modo a interação entre planta-inseto pode ser influenciada de forma positiva (MILLER et al., 2002; MEISTER et al., 2006; ESTRADA et al., 2013).

ESTRADA et al (2013) apontam que os compostos liberados após um ferimento na folha influenciam na escolha das formigas dentre plantas com menor ou maior presença de endofíticos no momento do forrageamento. Consequentemente, os fungos endofíticos como parceiros mutualistas de plantas proporcionam um maior controle de formigas-cortadeiras. Tornando-se assim uma excelente estratégia dentro do ecossistema florestal para o manejo dessa importante praga (ROCHA et al., 2017).

Diante disso, o trabalho objetivou avaliar o potencial de colonização endofítica de mudas de *E. urophylla* pelo fungo *T. strigosellum*, sob diferentes formas de inoculação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Universidade Federal do Tocantins, *Campus* de Gurupi, no Laboratório de Simbioses Insetos-Microrganismos.

Os isolados fúngicos de *T. strigosellum* utilizados nesta pesquisa foram coletados de uma amostra de solo proveniente do Bioma Cerrado localizada neste mesmo *Campus*. Para assegurar a homogeneidade dos fungos, foram obtidas colônias monospóricas dos isolados empregando a metodologia descrita por FERNANDEZ (1993). Em câmara de fluxo,

utilizando uma agulha níquel-cromo previamente flambada, transferiu-se esporos para um tubo Eppendorf, onde os esporos foram suspensos em 1mL de água esterilizada contendo Tween 80 (0,1%) e agitados em agitador tipo vórtex por 10 segundos. Em seguida, 100 µl da suspensão foi espalhada em placas de Petri contendo meio ágar-água. As placas foram seladas e incubadas a 25°C ± 2°C, com fotoperíodo de 12 horas até germinação dos esporos. Após a germinação, com auxílio de microscópio estereoscópico, foi cortado um pequeno pedaço de ágar onde foi localizado um esporo isolado e o mesmo transferido para uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) suplementado com 250 mg/L de cloranfenicol. As placas foram seladas e incubadas a 25°C ± 2°C, com fotoperíodo de 12 horas por 7 dias.

Em câmara de fluxo, foi colocado 20 mL de água destilada esterilizada com espalhante adesivo Tween 80 a 0,1% (v/v) em uma placa de Petri, e, em seguida raspou-se delicadamente a superfície com um pincel. Essa suspensão foi filtrada em camada tripla de gaze esterilizada para retenção de micélios e restos de meio de cultura. Foram realizadas algumas diluições para quantificação de esporos. A contagem de esporos/mL foi feita utilizando câmara de Neubauer, microscópio óptico e contador manual. A concentração de inóculos foi ajustada em 10⁸ esporos/mL.

As mudas de *E. urophylla* cultivar LCFA 013 foram produzidas a partir de sementes adquiridas na Empresa Sementes Caiçara Ltda. Em sacos de polietileno preto (12,5 x 12,5 cm) contendo substrato comercial Bioflora®, composto de casca de pinus/eucalipto, fibra de coníferas, carvão vegetal, rocha calcária, superfosfato simples, nitrato de amônia e casca de arroz. Foram semeadas cinco sementes e, após 30 dias da semeadura foi realizado raleio deixando somente a muda mais vigorosa em cada saco. As mudas foram regadas diariamente durante todo o ensaio. Oito semanas após a germinação da semeadura foram realizadas as inoculações via foliar e via solo.

Como descrito por PARSA et al. (2013), com algumas modificações, a inoculação via foliar foi realizada em 10 plantas com uma escovação prévia da folha, e utilizando um atomizador manual pulverizou-se no par intermediário de cada planta, na superfície adaxial na folha suspensão de esporos do fungo *T. strigosellum* até atingir a saturação. Nas 10 mudas controle, foi pulverizada apenas água destilada com espalhante adesivo (Tween 80) a 0,1% (v/v). As folhas pulverizadas foram marcadas com marcador d'água.

A inoculação via solo foi realizada com a aplicação de suspensão dos esporos com auxílio de um cilindro graduado na superfície solo, próximo a base de 10 plantas. E, novamente às outras 10 plantas controles foi aplicada água destilada esterilizada com espalhante adesivo (Tween 80) a 0,1% (v/v).

Após inoculações, as plantas foram transferidas para casa de vegetação e permaneceram cobertas com saco plástico transparente nas primeiras 48h para que se fosse mantido um alto nível de umidade.

A terceira forma de inoculação foi realizada em plântulas, que tiveram sua semeadura realizada em duas placas de Petri contendo meio ágar-água. As sementes foram previamente esterilizadas superficialmente por 10 minutos em hipoclorito de sódio a 1% e lavadas por três vezes em água destilada esterilizada. Após isso, foram distribuídas 70 sementes de eucalipto em cada placa, que foram seladas e incubadas a 25°C ± 2°C, com fotoperíodo de 12 horas. Seguindo a metodologia descrita por SIVIEIRO (2001), com algumas adaptações, a inoculação foi realizada após 7 dias da semeadura nas 10 plântulas mais vigorosas de cada placa. Com o auxílio de uma agulha flambada, provocou pequenos ferimentos nos caules das plântulas e, em seguida, o ferimento foi infestado com micélio de *T. strigosellum* para que o fungo tivesse contato com o interior das plântulas. Na segunda placa, nas plântulas controles foi realizado apenas o ferimento no caule. As placas com as plântulas foram seladas e incubadas a 25°C ± 2°C, com fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias foram transferidas para sacos de polietileno preto (12,5 x 12,5 cm) com substrato comercial Bioflora® autoclavado, onde foram regadas diariamente até avaliação.

Utilizando a metodologia empregada por PARSA et al. (2013) e ROCHA et al. (2017), com algumas modificações, a avaliação endofítica foi realizada através do processamento dos pares de folhas acima e abaixo das inoculadas via foliar e 5cm de caule acima e 5 cm abaixo para as plantas com inoculação foliar. Nas mudas com inoculação via solo, foram coletados os dois primeiros pares de folhas e dois fragmentos de 5cm de caule acima do solo. E nas mudas com inoculação via plântula foram coletadas 4 folhas aleatoriamente e foram retirados dois fragmentos de 5cm de caule e um pedaço no meio da raiz principal.

Os pedaços de folhas foram esterilizados superficialmente com imersão por 1 minuto em álcool 70% e 4 minutos em hipoclorito de sódio a 1% e em seguida lavando por três vezes em água destilada. Os pedaços de caule também foram esterilizados por meio de imersão por 2 minutos em hipoclorito de sódio a 1% e dois minutos em solução de álcool a 70% e lavagem em água esterilizada. Após esterilização fragmentos de cada material foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura BDA suplementado com 250 mg/L de cloranfenicol. 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.

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições, sendo cada parcela constituída por uma muda. Os fatores foram: uma espécie de fungo (*T. strigosellum*) mais um controle e três métodos de inoculação (inoculação via foliar, inoculação via solo e inoculação via plântula).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação via plântula colonizou 90% das plantas comparado aos outros métodos de inoculação, sendo que nesta inoculação o fungo foi isolado apenas nas raízes. Em contrapartida, quando inoculado no solo, o *T. strigosellum* foi capaz de chegar até o caule. A inoculação via foliar não possibilitou a colonização endofítica pelo fungo, sendo constatados resultados similares por outros estudos realizados com diferentes espécies. MACHADO et al. (2012) apontam que o

isolado fúngico *T. harzianum* testado no híbrido de *Eucalypto* ssp. foi localizado somente nas raízes. Já PEREIRA (2012) identificou fungos *Trichoderma* sp em raízes e caules em estudos realizados.

Tabela 1: Número de plantas de *E. urophylla* colonizada endofiticamente pelo fungo *T. strigosellum* por diferentes métodos de inoculação e em diferentes partes da planta.

Métodos de inoculação	Fungo	Partes da planta		
		Folha	Caule	Raiz
Inoculação via foliar	Controle	0/10	0/10	0/10
	<i>Trichoderma strigosellum</i>	0/10	0/10	0/10
Inoculação via solo	Controle	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>T. strigosellum</i>	0/10	0/10	9/10

As plantas controle do método de inoculação via solo apresentaram melhor desenvolvimento quando comparadas aos outros métodos (Tabela 1). Logo, os métodos de inoculação alcançaram dados estatísticos importantes para o desenvolvimento da planta.

CONCLUSÃO

O isolado *Trichoderma strigosellum* é capaz de colonizar endofiticamente *E. urophylla* por meio do método de inoculação via plântula e solo.

A partir dos resultados adquiridos é possível dar continuidade aos estudos obtendo mais plantas de *E. urophylla* com o endófito *T. strigosellum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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: Educ, 2002. p. 269-294.

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

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.

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.

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.

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.

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

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

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.

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.

MACHADO, D. F. M. et al. Trichoderma no Brasil: o fungo e o bioagente. **Rev. de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, n.1, p.274-288, jun. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2012000100026&lng=pt&nrm=iso>. Acessos em: 30 jun. 2019.

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.

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.; 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.

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 Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.

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.