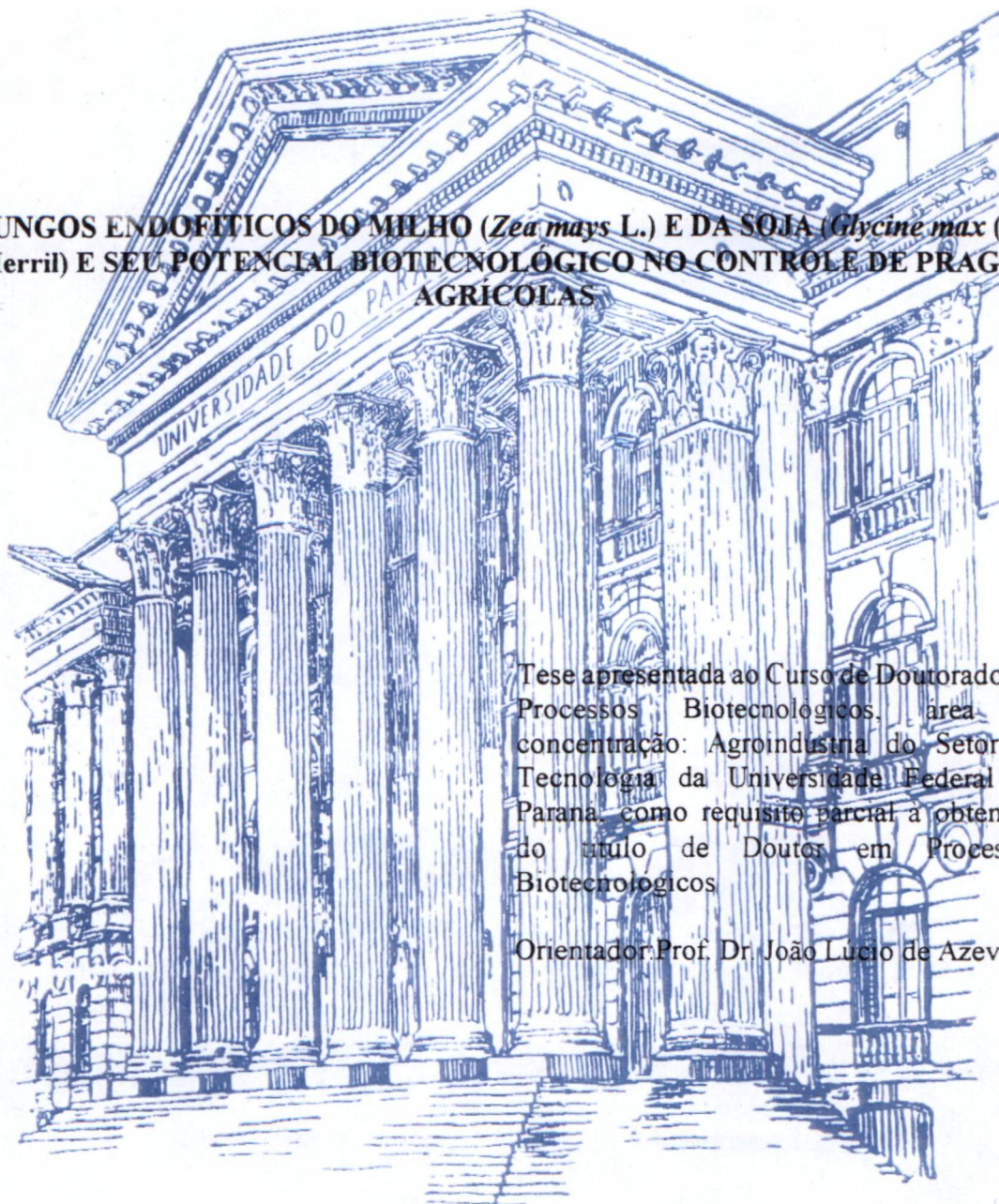


**IDA CHAPAVAL PIMENTEL**

**FUNGOS ENDOFITICOS DO MILHO (*Zea mays* L.) E DA SOJA (*Glycine max* (L.)  
Merril) E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO NO CONTROLE DE PRAGAS  
AGRICOLAS**



Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, área de concentração: Agroindústria do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Processos Biotecnológicos

Orientador: Prof. Dr. João Lucio de Azevedo

**CURITIBA  
2001**

**IDA CHAPAVAL PIMENTEL**

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DO MILHO (*Zea mays* L.) E DA SOJA (*Glycine max* (L.)  
Merril) E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO NO CONTROLE DE PRAGAS  
AGRÍCOLAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em  
Processos Biotecnológicos, área de  
concentração: Agroindústria do Setor de  
Tecnologia da Universidade Federal do  
Paraná, como requisito parcial à obtenção  
do título de Doutor em Processos  
Biotecnológicos

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

**CURITIBA  
2001**

A Jesus,  
pois “posso todas as coisas naquele que me fortalece”  
(Filipenses 4;13)

Aos meus filhos David e Pedro  
pelo apoio, carinho e  
compreensão

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por colocar-me diante das pessoas certas, que me ajudaram de uma forma ou de outra a ter a formação que tenho hoje. Principalmente à família, um grupo de pessoas maravilhosas que tive a chance de conhecer, o que a mim parece uma dádiva.

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo agradeço pela orientação, pelo incentivo e amizade.

À minha mãe Cirleuse que sempre me apoiou, pelo carinho e pelos exemplos de determinação.

Às minhas irmãs, Lea pelo companheirismo, amizade, força e colaboração; Lúcia pelo carinho, apoio e segurança nos momentos de desafio e Ana pela amizade.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Chirlei Glienke de Blanco pela sua valiosa colaboração imprescindível na confecção deste trabalho.

Ao Prof Juarez Gabardo, pela amizade, compreensão, incentivo, pela disposição em me orientar e sua valiosa colaboração no desenvolvimento das análises estatísticas, nas correções e interpretação dos dados.

Ao Prof. Arnoldo Meister Pimentel, pelo incentivo, disposição e valiosa colaboração no desenvolvimento das análises estatísticas, bem como na interpretação dos dados.

Ao Prof. Dr. José Sebastião Cunha Fernandes e a Prof<sup>a</sup> Lygia Vitória Galii Terasawa pelo empréstimo de materiais que tornaram possível a realização do experimento em casa de vegetação.

Ao Prof. Dr. Leonardo Novaes Rosse pela valiosa colaboração no desenvolvimento das análises estatísticas.

À amiga Ida Cristina Gubert, pela sua amizade, companheirismo, confiança e força nos momentos difíceis; por suas correções e sugestões valiosas .

À amiga Cristina Leise Bastos Monteiro pelo incentivo em começar o Doutorado, amizade, companheirismo e alegria que muito me sustentaram.

À amiga Rosângela Lameira Pinheiro pela amizade, apoio, incentivo e auxílio valioso e imprescindível na identificação dos fungos isolados.

À amiga Lucimeris Ruaro Schuta pelo empréstimo de bibliografias utilizadas na identificação dos fungos.

A todos os amigos do Doutorado em especial Ana, Francisco e Arion pela amizade e alegria que muito me incentivaram na realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos e estagiários Larissa, Ângela, Francilene, Marcos, Flávia, Michelle, Fábio, Patrícia, Alessandro e Cintia pela amizade, incentivo e colaboração imprescindível.

À amiga Eliana de Souza Penna pela confiança, colaboração e amizade.

Aos amigos especiais Leda e Nelson por suas orações, pelo incentivo e preciosa amizade.

À amiga Maria Aparecida Cassilha Zawadeneack pela grande e sincera amizade, companheirismo e alegria.

Ao Prof. Braulio Santos pela amizade, auxílio imprescindível na instalação do experimento de campo e casa de vegetação e no empréstimo de algumas bibliografias.

As amigas Vera Zanetti, Adriana Abreu Braz, Katia Simone Jaworski, Yanê de Carvalho, Eni Bompeixe, Marita Blaskowski, Ilma Higuti e ao amigo Hasuyoshi Hayashi, pela amizade, constante incentivo e agradável convivência.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanete Tomaz Soccol pela sua amizade, incentivo e empréstimo de vidrarias, do equipamento de microscopia ótica e de fotografia do Laboratório de Parasitologia Veterinária, essenciais para a realização de parte deste trabalho.

Às técnicas do Departamento de Patologia Básica, Clotilde, Josefina, Cirlei, Luciane, Juliana, Irene, Olinda pela disposição e colaboração constante.

À Prof<sup>a</sup> Edilene Alcântara e Fernanda Rozalinski pela auxílio e sugestões valiosas nas fotos de microscopia ótica.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Vânia Aparecida Vicente pelas valiosas sugestões, e auxílio nas fotos de microscopia ótica e eletrônica, essenciais para a realização de parte deste trabalho.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Cecília Iritani, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Marguerite Quoirin e funcionários do Laboratório de Micropropagação do Departamento de Botânica da UFPR pela valiosa colaboração e empréstimo do Laboratório para a realização de parte deste trabalho.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, em especial à Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Daura Regina Stofella pela atenção dispensada, bem como todas as funcionárias.

Ao Pr. Dr. Carlos Ricardo Soccol pelo incentivo e colaboração durante todo o Curso de Doutorado.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Aline Pizzirani Kleiner (ESALQ-USP) pela amizade e envio de referências bibliográficas importantes.

Ao Prof. Dr. Fábio Pedrosa pelo empréstimo da casa de vegetação do Departamento de Bioquímica – UFPR, o que tornou possível a realização de parte deste trabalho.

Aos técnicos Walter e ao Doutorando Humberto do Departamento de Bioquímica pela ajuda e sugestões durante o experimento em casa de vegetação.

Ao Prof. Luimar Perli, Prof. Ivan Deconto e Prof. Maurício Baby por ceder uma área na Fazenda Experimental do Cangüiri da UFPR para instalação do experimento de campo e disponibilizar a ajuda dos funcionários Edinei, Gaúcho e Ovídio.

Ao Sidival Ruppel fotógrafo do Setor de Ciências Biológicas pelas fotos que enriqueceram este trabalho.

Ao Dr. Daniel R. Sosa-Gomez (EMBRAPA-CNPS) pelo envio de algumas linhagens de fungos que muito me auxiliaram na identificação dos meus isolados.

Às bibliotecária Rute, Telma e Izabela pelo auxílio na obtenção dos materiais bibliográficos.

À amiga Vanessa Kava-Cordeiro pela amizade e incentivo.

À amiga Maria da Graça Bicalho Lacerda pela amizade e pelo empréstimo de materiais essenciais para realização de parte deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos, em especial à Patrícia e Juliana pela amizade e incentivo.

À todos os Professores e funcionários do Departamento de Genética pela amizade e colaboração.

E a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	4
2.1.1 Considerações gerais.....	4
2.1.2 Isolamento de endofíticos.....	6
2.1.3 Relação com o hospedeiro.....	8
2.1.3.1 Endófitos e o controle biológico de insetos.....	16
2.1.3.2 Fungos endofíticos entomopatogênicos.....	29
2.1.3.3 Manipulação genética e biotecnologia em microrganismos endofíticos.....	33
2.2 HOSPEDEIROS UTILIZADOS E O CONTROLE BIOLÓGICO.....	38
2.2.1 Milho ( <i>Zea mays</i> L.).....	38
2.2.2 Soja ( <i>Glycine max</i> L. Merrill).....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1 MATERIAL.....	47
3.1.1 Milho.....	47
3.2.2 Soja.....	49
3.3 MEIOS DE CULTURA.....	51
3.3.1 Meio Ágar-Água (AA).....	51
3.3.2 Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA).....	51
3.3.3 Meio Ágar Farinha de Aveia (AFA)(CHASE, OSBORNE e FERGUSON, 1986).....	52
3.3.4 Meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962).....	52
3.4 CORANTE E CLAREADOR.....	53
3.4.1 Lactofenol azul de algodão (CRUZ, 1981).....	53
3.4.2 Lactofenol de Amann. (CRUZ, 1981).....	53
3.5 SOLUÇÕES.....	54
3.5.1 Benomil.....	54
3.5.2 Solução fixadora para microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	54
3.6 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	54
3.6.1 Isolamento de fungos endofíticos de sementes.....	55
3.7 FREQUÊNCIAS DE INFECÇÃO.....	56
3.8 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	56
3.8.1 Método de cultura em lâmina ou técnica do microcultivo(KERN e BLEVINS, 1999).....	56
3.8.2 Técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (STOFELLA, 1994).....	57
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DO MILHO ( <i>Zea mays</i> L.).....	59
4.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DA SOJA ( <i>Glycine max</i> L. Merrill).....	69
4.3 GÊNEROS ISOLADOS DO MILHO E DA SOJA.....	77
4.4 FUNGOS ENDOFÍTICOS DO MILHO ( <i>Zea mays</i> L.).....	89
4.5 FUNGOS ENDOFÍTICOS DA SOJA( <i>Glycine max</i> (L).Merril).....	99

4.6 FUNGOS ENDOFÍTICOS ENTOMOPATOGÊNICOS DO MILHO ( <i>Zea mays</i> L.) E DA SOJA ( <i>Glycine max</i> (L.)Merril).....	107
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	110
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	111
<b>ANEXOS</b> .....	145

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - NÚMERO E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO EM 144 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS E DISTRIBUÍDOS CONFORME AS ORIGENS, TEMPERATURAS E MEIOS DE CULTURA.....	60
TABELA 2 - NÚMERO E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO EM 432 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS DISTRIBUÍDOS CONFORME AS ORIGENS E TEMPERATURAS.....	62
TABELA 3 - NÚMERO E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO EM 432 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS DISTRIBUÍDOS CONFORME AS ORIGENS E OS ÓRGÃOS DA PLANTA.....	63
TABELA 4 - NÚMERO E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO EM 288 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS DISTRIBUÍDOS AS ORIGENS E OS MEIOS DE CULTURA.....	64
TABELA 5 - NÚMERO E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DO MILHO EM 432 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS E DISTRIBUÍDOS CONFORME AS ORIGENS E A IDADE DAS PLANTAS.....	65
TABELA 6 -NÚMERO E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO EM 432 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS DISTRIBUÍDOS CONFORME OS ÓRGÃOS E IDADE DAS PLANTAS.....	66
TABELA 7 - NÚMERO E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA EM 432 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS E DISTRIBUÍDOS CONFORME AS ORIGENS, TEMPERATURAS E MEIOS DE CULTURA.....	69
TABELA 8 - NÚMERO E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA EM 432 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS DISTRIBUÍDOS CONFORME AS ORIGENS E TEMPERATURAS.....	72
TABELA 9 - NÚMERO E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA EM 432 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS DISTRIBUÍDOS CONFORME AS ORIGENS E REGIÕES DA PLANTA.....	72
TABELA 10 - NÚMERO E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA EM 432 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS DISTRIBUÍDOS CONFORME AS ORIGENS E IDADE DAS PLANTAS.....	74
TABELA 11 - NÚMERO E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA EM 432 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS DISTRIBUÍDOS CONFORME AS TEMPERATURAS E ÓRGÃOS DAS PLANTAS.....	76

TABELA 12 - NÚMERO E PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO TOTAL DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO DO CAMPO CONSIDERANDO DIFERENTES IDADES, TEMPERATURAS, ÓRGÃOS DAS PLANTAS, PARTES DAS PLANTAS E MEIOS DE CULTURA.....	91
TABELA 13 - NÚMERO E PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO TOTAL DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DO MILHO DA CASA DE VEGETAÇÃO CONSIDERANDO DIFERENTES IDADES, TEMPERATURAS, ÓRGÃOS DAS PLANTAS, PARTES DAS PLANTAS E MEIOS DE CULTURA.....	92
TABELA 14 - NÚMERO E PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO TOTAL DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA NO CAMPO CONSIDERANDO DIFERENTES IDADES, TEMPERATURAS, ÓRGÃOS DAS PLANTAS, PARTES DAS PLANTAS E MEIOS DE CULTURA.....	102
TABELA 15 - NÚMERO E PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO TOTAL DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA DA CASA DE VEGETAÇÃO CONSIDERANDO DIFERENTES IDADES, TEMPERATURAS, ÓRGÃOS DAS PLANTAS, PARTES DAS PLANTAS E MEIOS DE CULTURA.....	103

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO MILHO.....	48
FIGURA 2 - ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DA SOJA.....	50
FIGURA 3- PORCENTAGEM DE FRAGMENTOS INFECTADOS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS EM PLANTAS DE MILHO EM UMA AMOSTRA DE 864 FRAGMENTOS EM RELAÇÃO A DIFERENTES ORIGENS.....	59
FIGURA 4 - PORCENTAGEM DE FRAGMENTOS INFECTADOS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE MATERIAL ORIGINADO DE PLANTAS DE MILHO CONSIDERANDO AS ORIGENS E DIFERENTES ÓRGÃOS DA PLANTA.....	64
FIGURA 5 - PORCENTAGEM DE FRAGMENTOS INFECTADOS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE MATERIAL ORIGINADO DE PLANTAS DE MILHO CONSIDERANDO AS ORIGENS E DIFERENTES IDADES DAS PLANTAS (20 DIAS E 40 DIAS).....	65
FIGURA 6 - PORCENTAGEM DE FRAGMENTOS INFECTADOS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE MATERIAL ORIGINADO DE PLANTAS DE MILHO DO CAMPO, E DA CASA DE VEGETAÇÃO CONSIDERANDO OS ÓRGÃOS DAS PLANTAS (COLMO E FOLHA) EM DIFERENTES IDADES DAS PLANTAS (20 DIAS E 40 DIAS).....	66
FIGURA 7 - PORCENTAGEM DE FRAGMENTOS INFECTADOS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS EM PLANTAS DE SOJA EM UMA AMOSTRA DE 864 FRAGMENTOS EM RELAÇÃO A DIFERENTES ORIGENS.....	70
FIGURA 8 - PORCENTAGENS DE FRAGMENTOS INFECTADOS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS DE SOJA ORIGINADAS DO CAMPO E DA CASA DE VEGETAÇÃO, CONSIDERANDO AS DIFERENTES PARTES DA PLANTA (FOLHAS E HASTES COLETADAS DA PARTE INFERIOR E SUPERIOR DAS PLANTAS).....	73
FIGURA 9 - PORCENTAGENS DE FRAGMENTOS INFECTADOS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS DE SOJA, CONSIDERANDO AS DIFERENTES ORIGENS E DIFERENTES IDADES DAS PLANTAS (20 DIAS E 40 DIAS).....	74
FIGURA 10 - A - COLÔNIA DE <i>Alternaria</i> sp., ISOLADO DA FOLHA DA PARTE INFERIOR DA PLANTA DO MILHO DO CAMPO AOS 40 DIAS A 37°C EM MEIO BDA. B - FOTOMICROGRAFIA DE MACROCONÍDIOS MULTICLEULARES, DIVIDIDOS POR SEPTOS TRANSVERSAIS E LONGITUDINAIS DE <i>Alternaria</i> sp. (AUMENTO DE 400X).....	78
FIGURA 11 - A- COLÔNIA DE <i>Cladosporium</i> sp., ISOLADO DA FOLHA DA PARTE INFERIOR DA PLANTA DO MILHO DO CAMPO AOS 40 DIAS A 28°C EM MEIO BDA. B - FOTOMICROGRAFIA DE CONÍDIOS OVAIS DE <i>Cladosporium</i> sp. EM LARGAS CADEIAS A PARTIR DE CONIDIÓFOROS RAMIFICADOS (AUMENTO DE 400X).....	78
FIGURA 12 - A -COLÔNIA DE <i>Curvularia</i> sp., ISOLADO DA FOLHA DA PARTE INFERIOR DA PLANTA DO MILHO AOS 40 DIAS, A 37°C EM MEIO BDA. B - MACROCONÍDIOS MULTICELULARES DE <i>Curvularia</i> sp. DIVIDIDOS POR TABIQUES TRANSVERSAIS COM CÉLULAS CENTRAIS QUE PRODUZEM UM ASPECTO CURVADO (AUMENTODE 400X).....	79

FIGURA 13 - A - COLÔNIA DE <i>Chaetomium</i> sp., ISOLADO DO COLMO DA PARTE SUPERIOR DA PLANTA DO MILHO DO CAMPO AOS 40 DIAS A 28°C EM MEIO AA. B - HIFAS SEPTADAS DE <i>Chaetomium</i> sp. COM PERITÉCIO OVAL COM APÊNDICES FILAMENTOSOS RETOS (AUMENTO DE 400X).....	79
FIGURA 14 - A - COLÔNIA DE <i>Scopulariopsis</i> sp., ISOLADO DO COLMO DA PARTE INFERIOR DA PLANTA DO MILHO AOS 40 DIAS A 28°C EM MEIO BDA. B - MICROFOTOGRAFIA DE <i>Scopulariopsis</i> sp. MOSTRANDO LONGAS CADEIAS DE CONÍDIOS PRODUZIDOS NAS PONTAS (AUMENTO DE 400X).....	79
FIGURA 15 - A - COLÔNIA DE <i>Drechslera</i> sp., ISOLADO DO COLMO DA PARTE INFERIOR DA PLANTA DO MILHO DO CAMPO AOS 40 DIAS A 28°C EM MEIO AA. B - FOTOMICROGRAFIA DE <i>Drechslera</i> sp., DISPOSIÇÃO SIMPODIAL DE MACROCONÍDIOS MULTICELULARES AO LONGO DE UM CONIDIÓFORO (AUMENTO DE 400X).....	79
FIGURA 16 - A - COLÔNIA DE <i>Colletotrichum</i> sp., ISOLADO DO COLMO DA PARTE SUPERIOR DA PLANTA DO MILHO DE CASA DE VEGETAÇÃO AOS 20 DIAS A 28°C EM MEIO BDA. B - CONÍDOS DE <i>Colletotrichum</i> sp. LIGEIRAMENTE AFILADOS, CURVOS, UNICELULARES E HIALINOS, SAINDO ISOLADAMENTE DE CONIDIÓFOROS (AUMENTO DE 400X).....	82
FIGURA 17 - A - COLÔNIA DE <i>Fusarium</i> sp., ISOLADO DA FOLHA DA PARTE INFERIOR DA PLANTA DE SOJA NO CAMPO AOS 40 DIAS A 28°C EM MEIO AFA B - CONÍDIOS GRANDES DE <i>Fusarium</i> sp., CURVADOS E SEPTADOS COM FORMATO DE CANOA( AUMENTO DE 400X).....	82
FIGURA 18 - A - COLÔNIA DE <i>Acremonium</i> sp., ISOLADO DA FOLHA DA PARTE SUPERIOR DA PLANTA DO MILHO DO CAMPO AOS 40 DIAS A 37°C EM MEIO BDA. B - CONÍDOS ELÍPTICOS DE <i>Acremonium</i> sp. NAS PONTAS DE FIÁLIDES DELICADAS (AUMENTO DE 400X).....	83
FIGURA 19 - A - COLÔNIA DE <i>Aspergillus niger</i> , ISOLADO DO COLMO DA PARTE INFERIOR DA PLANTA DO MILHO DE CASA DE VEGETAÇÃO AOS 20 DIAS A 37°C EM MEIO BDA. B - CABEÇA DE <i>Aspergillus niger</i> , UMA FILEIRA DE FIÁLIDES COM ESPORULAÇÃO NOS TERÇOS SUPERIORES DAS VESÍCULAS (AUMENTO DE 400X).....	83
FIGURA 20 - A - COLÔNIA DE <i>Penicillium</i> sp., ISOLADO DO COLMO DA PARTE INFERIOR DA PLANTA DO MILHO DE CASA DE VEGETAÇÃO A 28°C EM MEIO AA. B- HIFAS SEPTADAS DE <i>Penicillium</i> sp. COM MÉTULAS RAMIFICADAS COM FIÁLIDES DE ONDE DERIVAM CADEIAS DE CONÍDIOS (AUMENTO DE 400X).....	84
FIGURA 21 - A - COLÔNIA DE <i>Mycelia sterilia</i> , ISOLADO DA FOLHA DA PARTE SUPERIOR DA PLANTA DO MILHO DO CAMPO AOS 20 DIAS A 28°C EM MEIO AA. B - HIFAS SEPTADAS DE <i>Mycelia sterilia</i> (AUMENTO DE 400X).....	84
FIGURA 22 - A - COLÔNIA DE <i>Beauveria</i> sp., ISOLADO DO COLMO DA PARTE SUPERIOR DA PLANTA DO MILHO EM CASA DE VEGETAÇÃO AOS 20 DIAS A 28°C EM MEIO BDA. B - CONÍDIOS OVAIS E ELIPSÓIDES DE <i>Beauveria</i> sp. (AUMENTO DE 400X).....	86

FIGURA 23 - CONÍDIOS GLOBOSOS OU SUBGLOBOSOS COM CONIDIÓFOROS FORMANDO DENSOS CACHOS DE <i>Beauveria</i> sp., FIÁLIDES COM A PARTE BASA DILATADA TERMINANDO EM ZIGUEZAGUE BEM DEFINIDOS (MEV - AUMENTO DE 4986 X).....	87
FIGURA 24 - A - COLÔNIA DE <i>Paecilomyces</i> sp., ISOLADO DA FOLHA DA PARTE INFERIOR DA PLANTA DA SOJA DO CAMPO AOS 20 DIAS A 28°C EM MEIO BDA. B - CONIDIÓFOROS SIMPLES DE <i>Paecilomyces</i> sp. OU EM SINEMA VERTICILADO SUSTENTANDO AS FIÁLIDES (AUMENTO DE 400X).....	87
FIGURA 25 - CONIDIÓFOROS SIMPLES OU EM SINEMA DE <i>Paecilomyces</i> sp. VERTICILADOS E SUSTENANDO FIÁLIDES COM PESCOÇO, CONÍDIOS ELÍPTICOS UNICELULARES (MEV- AUMENTO 2575X).....	88
FIGURA 26 - NÚMERO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO EM CAMPO E EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	90
FIGURA 27 - PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO DO CAMPO E DE CASA DE VEGETAÇÃO, CONSIDERANDO AS DIFERENTES IDADES DAS PLANTAS (20 DIAS E 40 DIAS).....	95
FIGURA 28 - PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO DO CAMPO E DA CASA DE VEGETAÇÃO NOS DIFERENTES ÓRGÃOS DA PLANTA (COLMO E FOLHA).....	97
FIGURA 29 - NÚMERO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA NO CAMPO E EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	100
FIGURA 30 - PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA DO CAMPO E DE CASA DE VEGETAÇÃO EM DIFERENTES IDADES AOS 20 DIAS E AOS 40 DIAS.....	104
FIGURA 31 - PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA DO CAMPO E DE CASA DE VEGETAÇÃO NAS HASTES E FOLHAS NA PARTE INFERIOR E SUPERIOR DA PLANTA (h <sub>pip</sub> = haste da parte inferior da planta, h <sub>p<sub>sp</sub></sub> = haste da parte superior da planta, f <sub>pip</sub> = folha da parte inferior da planta, f <sub>p<sub>sp</sub></sub> = folha da parte superior da planta).....	106

## RESUMO

Fungos endofíticos foram isolados dos hospedeiros tropicais milho (*Zea mays* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Os fungos foram isolados de plantas originadas do campo e de casa de vegetação, de diferentes órgãos vegetativos das plantas; folhas e colmos do milho e folhas e hastes da soja e coletadas em diferentes idades aos 20 dias e aos 40 dias após a germinação das sementes. Foram isolados nove grupos de fungos do milho e isolados oito grupos da soja. Os gêneros encontrados foram: *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mycelia sterilia*, *Beauveria* sp., *Paecilomyces* sp. e fungos dematiáceos. Na soja não foi encontrado o gênero *Beauveria* sp.. Dentre estes fungos endofíticos dois importantes entomopatógenos *Beauveria* sp. e *Paecilomyces* sp. foram isolados em condições de campo e casa de vegetação. Foram detectadas diferenças qualitativas e quantitativas entre os isolados de milho e soja e dentro das culturas, em relação a micobiota de hospedeiros provenientes do campo em comparação com os de casa de vegetação.

Palavras-chave: Fungos Endofíticos, Milho, Soja, Controle Biológico

## ABSTRACT

Endophytic fungi were isolated from two tropical host, maize and soybean. Fungal species isolated from plants in the field and in the greenhouse, were found in different organs : the leaves and stems of maize and leaves and stems of soybean. They were collected at twenty days and forty days after seed germination. Were isolated nine groups the fungi of maize and eight groups of soybean. The genus founded were: *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mycelia sterilia*, *Beauveria* sp., *Paecilomyces* sp. and dematiaceous fungi, but no *Beauveria* sp was found in soybean. Among these endophytic fungi two important entomopathogenous *Beauveria* sp and *Paecilomyces* sp. were isolated from the field and greenhouse plants. Qualitatives and quantitatives differences were detected among these isolates of maize and soybean and between these cultures in relation to the micobiota from field hosts when compared to greenhouse hosts.

Key-words: Endophytic Fungi, Maize, Soybean, Biological Control

## 1 INTRODUÇÃO

O controle natural e biológico vem se mostrando uma alternativa eficaz e viável no controle de pragas e doenças de plantas cultivadas sem agressão ao ambiente. No Brasil as pragas causam danos consideráveis e prejudicam boa parte da colheita devido às extensas áreas ocupadas por agricultura intensiva e boas condições climáticas. Os danos causados pelas pragas em plantas cultivadas são intensos e de difícil avaliação, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (ROBBS, 1994).

A produção média do milho no Paraná é uma das maiores do país, cerca de 37 a 38 milhões de toneladas, mas ainda assim está muito aquém do potencial da cultura. Vários fatores determinam essa situação. As pragas prejudicam o milho na fase de plântula, reduzindo a densidade de semeadura, causam danos diretos e indiretos à produção durante a fase vegetativa e reprodutiva e interferem na produtividade real pelos danos aos grãos durante o armazenamento. A demanda por milho de melhor qualidade e por rendimentos elevados para viabilizar a produção econômica exige adoção de tecnologias avançadas. Neste contexto faz-se necessário o conhecimento sobre a fauna associada à cultura do milho para evitar os danos causados pelas pragas (GASSEN, 1996).

A cultura da soja, que ocupa o segundo lugar no país, considerando-se a área cultivada e a produtividade, é de extrema importância econômica para o Estado do Paraná que é um dos maiores produtores e para o Brasil, não somente em termos de divisas (exportação), mas para alimentação humana e animal (ROBBS e BITTENCOURT, 1998).

A monocultura da soja, implantada como alternativa de exploração agrícola, desfavorece o equilíbrio do ambiente e favorece a explosão populacional de pragas, cuja ação é responsável pela perda de aproximadamente 30% da produtividade. A cultura da soja está sujeita ao ataque de insetos durante praticamente todo o seu ciclo.

A partir dos anos quarenta, o controle destes insetos tem sido feito, principalmente, pelo uso de inseticidas químicos, método eficiente em muitos casos. Entretanto, o uso em larga escala desses produtos, realizado muitas vezes de maneira inapropriada, tem levado à resistência genética dos insetos, à semelhança do que tem

ocorrido com relação à resistência bacteriana aos antibióticos e dos fungos patogênicos aos fungicidas.

Embora alguns desses produtos, como inseticidas e fungicidas visem, respectivamente, ao controle de pragas e fungos fitopatogênicos, eles também são responsáveis pela eliminação de espécies úteis, como insetos controladores de pragas e microrganismos que desempenham um papel importante no ambiente, controlando o crescimento e a multiplicação de outros microrganismos e que, devido aos desequilíbrios surgidos, tornam-se patógenos. Um dos grupos mais afetados por essas modificações antropogênicas é o dos endófitos, incluindo aí, principalmente, fungos e bactérias. Microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior de plantas, principalmente folhas, ramos e caule, sem causar, aparentemente, qualquer dano ao seu hospedeiro (AZEVEDO, 1998). Principalmente a partir dos anos 70, estes organismos, até então considerados neutros, ou seja, não causavam benefícios nem tampouco prejuízos às plantas, passaram a ser melhor estudados e concluiu-se que, em vários casos analisados, desempenham importante papel na proteção do hospedeiro contra o ataque de predadores e patógenos.

Fungos entomopatogênicos bastante conhecidos e já largamente empregados no controle biológico de insetos pragas da agricultura são encontrados como endófitos. Esse é o caso de *Beauveria bassiana*, encontrado como endófito no milho protegendo o hospedeiro contra o ataque de insetos (BING e LEWIS, 1993). Muitos outros casos são relatados, como pode ser apreciado na revisão de BREEN (1994).

O controle biológico de insetos pelo emprego de endófitos, embora esteja em fase inicial, é promissor, principalmente porque o uso da tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética contribuiu para uma nova dimensão ao processo.

A importância deste trabalho reside no fato que os trabalhos nessa promissora linha de pesquisa são poucos e a grande maioria é realizada em condições de clima temperado, nos quais o problema de controle de pragas agrícolas não é tão premente como em culturas de clima tropical como o milho e a soja.

Sendo assim, objetivou-se, neste trabalho, o isolamento de fungos endofíticos de plantas de campo e casa de vegetação de milho e soja com vistas a verificação da

sua incidência como potencial controladores de pragas e doenças, a purificação e identificação dos fungos isolados e a detecção de microrganismos entomopatogênicos capazes de atuar no controle de pragas agrícolas .

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Fungos endofíticos

#### 2.1.1 Considerações gerais

Fungos endofíticos ocupam um nicho ecológico e exercem grande influência na distribuição, ecologia, fisiologia e bioquímica das plantas. A maioria dos estudos com estes fungos tem sido realizada em coníferas e angiospermas de regiões temperadas e somente recentemente a microbiota de ecossistemas tropicais tem sido investigada.

Fungos endofíticos são aqueles que vivem no interior das plantas, habitando, de modo geral, suas partes aéreas, como folhas e caules, sem causar sintoma de doença (CARROLL, 1988; CLAY, 1988; PETRINI, 1991; ISAAC, 1992; WILSON, 1993; PEREIRA, 1993; WENNSTROM 1994; GLIENKE, 1995; RIBEIRO, 1995; WILSON, 1995; CHANWAY, 1996; LONGO, 1995; SOUZA, 1996; AZEVEDO, 1998). Estes microrganismos vivem em uma associação que pode ser antagônica, neutra ou mesmo benéfica para o hospedeiro, exibindo vários graus de interdependência fisiológica e ecológica.

Todos os microrganismos que habitam, pelo menos durante um período de seu ciclo vital, o interior de um vegetal podem ser considerados endofíticos. A distinção entre microrganismos endofíticos, epifíticos (que vivem na superfície das plantas) e fitopatogênicos (responsáveis por doenças em plantas) é de cunho puramente didático, havendo uma gradação entre eles, o que dificulta a definição de limites claros entre as três categorias (FOKKEMA e VAN DEN HEUVEL, 1986; ISAAC, 1992; REDLIN e CARRIS, 1996 e AZEVEDO, 1998).

O termo endofítico foi utilizado inicialmente por BARY em 1866, citado por STONE (1986) e foi aplicado à microbiota interna dos tecidos vegetais, em casos de infecções assintomáticas ou não, e nos casos de interações antagonísticas ou simbióticas. Em 1988, CARROLL utilizou o termo endofítico para organismos que causam colonizações assintomáticas em folhas e ramos de plantas saudáveis, sendo encontrados frequentemente no interior das plantas.

Com o aumento das investigações na área e com as descobertas de diferentes

aspectos da interação dos fungos com os seus hospedeiros, PETRINI (1991) propôs para o termo endofítico uma maior abrangência, a fim de incluir todos os microrganismos que habitam a parte aérea das plantas, que são capazes de colonizar, em alguma fase de seu ciclo de vida, os tecidos internos dos vegetais sem causar dano aparente.

O uso indiscriminado do termo endofítico tem causado certa confusão. Segundo SINCLAIR (1991), muitos fitopatógenos latentes são isolados do interior de tecidos vegetais, mostrando dessa forma a dificuldade em se distinguir estes de endófitos verdadeiros, segundo a definição de PETRINI (1991). Algumas vezes a patogenicidade está relacionada com a fase sexual do fungo, neste caso, SINCLAIR (1991), propôs o termo endófito clavicipitáceo anamorfo, para o fungo mutualista, e endófito clavicipitáceo teleomorfo para o patogênico.

Trabalhos de pesquisa sobre estes microrganismos, principalmente envolvendo o isolamento e caracterização de fungos, são relativamente recentes, mas relatos sobre a ocorrência dos mesmos vêm se acumulando, constatando-se sua existência nos mais diversos vegetais (CARROLL e CARROLL, 1978; PETRINI, STONE e CARROLL, 1982; WHITE JR. e COLE, 1985; CLAY, 1987 e 1989; BERTONI e CABRAL, 1988; CARROLL, 1988; CERKAUSKAS, 1988; JOHNSON e WHITNEY, 1989, KINDEL, ANDREWS e NORDHEIM, 1989, FISHER e PETRINI, 1990; RODRIGUES e SAMUELS, 1990; SINCLAIR, 1991, FISHER, PETRINI e LAPPIN SCOTT, 1992; MCCUTCHEON, CARROLL e SCHWAB, 1993; KOWALSKI e SADLOWSKI, 1993; PEREIRA, AZEVEDO e PETRINI, 1993; WHITE JR., MORGAN-JONES e MORROW, 1993; SNETSELAAR e MIMS, 1994, VIRET e PETRINI, 1994; GLIENKE, 1995; LONGO, 1995; BILLS, REDLIN e CARRIS, 1996, KOWALSKI, KEHR, REDLIN e CARRIS, 1996; MILES et al., 1998; RODRIGUES e SAMUELS, 1999; PENNA, 2000). Recentemente alguns trabalhos procuraram compreender um pouco mais a interação de fungos endofíticos com seus hospedeiros. Exemplos são citados por PETERS et al. (1998), que compararam a relação do endófito com o seu hospedeiro e com plantas não hospedeiras e por PEREIRA, VIEIRA e AZEVEDO (1999), os quais estudaram a competição entre linhagens selvagens e mutantes

reintroduzidas na planta. Mais de 300 espécies de plantas, principalmente gramíneas e coníferas, foram relatadas como hospedeiras assintomáticas de fungos, e a análise desses trabalhos revelou que os fungos endofíticos são, com poucas exceções, Ascomycetos, incluindo Loculoascomycetos, Discomycetos e Pirenomicetos (CARROLL, 1988). Contudo, há predominância de uma ou poucas espécies de fungos em um determinado hospedeiro, mostrando uma reduzida variabilidade na microbiota micótica, sendo que a composição das espécies pode variar em relação à espécie vegetal e distribuição geográfica dos hospedeiros, idade das plantas, condições ecológicas e sazonais, incluindo altitude e precipitação anual (CARROLL e CARROLL, 1978; CARROLL, 1988; WILSON, CLEMENTE e KAISER, 1991 e AGOSTINI, TIMMER e MITCHELL, 1992). Segundo WHITE JR. e COLE (1985), a presença de endófitos em gramíneas pode variar dentro de espécies de um mesmo gênero de hospedeiro.

### 2.1.2 Isolamento de endófitos

A melhor maneira de se estudar os fungos endofíticos é o seu isolamento e cultivo em laboratório, com cuidados especiais para excluir os microrganismos que vivem na superfície do hospedeiro, ou seja os epifíticos. O processo de esterilização por meio da desinfecção superficial, assim como os períodos de tempo necessários para tal, variam conforme o hospedeiro, e dependem basicamente da espessura da cutícula e da epiderme dos tecidos (PEREIRA, AZEVEDO e PETRINI, 1993). Testes preliminares devem ser feitos para determinação dos períodos de tempo ideais de tratamento, que eliminem microrganismos epifíticos sem destruir os endófitos (PEREIRA, 1993; PEREIRA, AZEVEDO e PETRINI, 1993; SCHULTZ et al., 1993; FISHER et al., 1994; AZEVEDO, 1998; BLANCO, 1999).

A presença dos endofíticos tem sido demonstrada principalmente pelo isolamento de fungos após a esterilização superficial dos tecidos para que sejam excluídos os microrganismos que vivem na superfície do hospedeiro, ou seja, os epifíticos e crescimento dos microrganismos em meio de cultura apropriado

(MCONIE, 1964; SPURR e WELTY, 1975; CARROLL e CARROLL, 1978; PETRINI, STONE e CARROLL, 1982; JOHNSON e WHITNEY, 1989; FISHER e PETRINI, 1990; LEUCHTMANN et al., 1992 ; PEREIRA, 1993; WHITE JR., MORGAN- JONES e MORROW, 1993; GLIENKE, 1995; BILLS, REDLIN e CARRIS, 1996).

Segundo CARROLL (1986) e PETRINI (1986) há vários trabalhos testando métodos de esterilização, e em alguns, o processo utilizado não é eficaz, permitindo o isolamento de determinados saprófitas epifíticos, como *Cladosporium* spp., *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *Auereobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud, e *Epicoccum purpurascens* Ehrh. Ex Schlect, após a esterilização da superfície das plantas, pois segundo PETRINI (1986), é possível que alguns esporos ou fragmentos de hifas possam sobreviver aos processos de esterilização. Entretanto, SCHULZ et al., (1993) demonstraram que os endófitos isolados de folhas esterilizadas externamente com métodos baseados em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) ou em formaldeído, eram morfológicamente diferentes dos epifíticos, mesmo quando pertencentes à mesma espécie. Isolados idênticos aos epifíticos só foram encontrados quando apenas etanol 50% foi utilizado para esterilização externa das folhas.

CABRAL (1985) verificou que fungos que habitam a superfície externa das folhas podem colonizar o interior de órgãos de plantas, principalmente quando há um decréscimo de espécies endofíticas após o início do processo de senescência dos tecidos. Tais fungos, denominados por PETRINI (1986) de endófitos facultativos, estão relacionados com a decomposição da matéria orgânica e são mais freqüentemente isolados de tecidos velhos. Portanto, segundo AZEVEDO (1998) alguns pontos importantes a serem considerados no isolamento de endófitos são a idade da planta e dos órgãos utilizados, o local, a idade da planta na coleta, bem como muitas vezes a necessidade de várias coletas para distinguir os reais endófitos dos microrganismos epifíticos e até mesmo contaminantes.

Outros métodos para a detecção de endófitos têm sido também empregados. WHITE JR. et al. (1993) usando técnicas de coloração de microscopia ótica, detectaram a presença de micélio no espaço intercelular de folhas, sementes e talos, de

*Festuca arundinaceae* (gramínea). WILSON et al. (1991), demonstraram a presença de hifas endofíticas em folhas e sementes de cinco espécies de *Lolium*, e em 1985 WHITE JR. e COLE evidenciaram o crescimento intercelular de hifas em sementes de *F. arundinaceae* e *F. arizonica*. Com o emprego da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET), VIRET e PETRINI, em 1994, além de detectar a presença de hifas em folhas de *Faia*, também descreveram a cinética do processo de colonização pelo fungo endofítico *Discula umbrinella*. Métodos sorológicos como ELISA, RIA, SRIA e SSEM, e técnicas de bioensaio, utilizando paraquat (SINCLAIR, 1991; GINDRAT e PEZET, 1994) ou testes biológicos com afídios (CLEMENT et al., 1990 e WILSON et al., 1991), foram desenvolvidos e métodos envolvendo não só a localização, como também a quantificação, do endófito na planta tem sido empregados (HERD et al., 1997).

### 2.1.3 Relação com o hospedeiro

De acordo com BERNSTEIN e CARROLL (1977), a infecção interna de folhas pode ser originada pela infecção sistêmica de sementes e pecíolos, por micélio de fungos epifíticos que penetram na planta por aberturas naturais como raízes, estômatos e hidatódios, e também por aberturas causadas por insetos e até por estruturas de fungos patogênicos como os apressórios, citados por SHERWOOD-PIKE, STONE e CARROLL (1986) no sistema *Rhabdocline-Pseudotsuga*. A penetração ativa de endófitos pode se dar pela produção de enzimas ou estruturas que facilitem a penetração no hospedeiro (AZEVEDO, 1998).

Segundo WHITE JR. e COLE (1985) e CARROLL (1988), em gramíneas como *Festuca* sp. o endófito *Acremonium* sp. forma infecção sistêmica e é transmitido de uma geração para outra por meio de sementes do hospedeiro, sem a necessidade de esporulação (CLAY, 1988). Estes fungos foram denominados por CARROLL (1988) de mutualistas obrigatórios (constitutivos); porém, na maioria das plantas, os endófitos mutualistas facultativos (não são transmitidos via semente), propagam-se aparentemente por meio de esporos, sendo dispersos principalmente pela chuva e

correntes de ar, podendo também a dispersão ocorrer através de propágulos vegetativos de alguns hospedeiros. Estes fungos possuem uma associação muito menor com o hospedeiro quando comparados aos mutualistas constitutivos, geralmente vivendo em tecidos senescentes ou metabolicamente inativos, tais como o córtex ou epiderme, e colonizando tecidos vitais somente quando o hospedeiro é ferido ou estressado por ataques de insetos ou patógenos (CARROLL, 1988 e MCCUTHEON, CARROLL e SCHWAB, 1993).

Em gramíneas, são encontrados os dois tipos de relação endófito-planta. Estes endófitos, pertencentes à família *Clavicipitaceae*, são divididos em 3 grupos. A maioria das espécies (incluindo todos com reprodução assexuada) podem colonizar sistemicamente a planta, a partir de sementes infectadas produzidas pela planta mãe (transmissão vertical). Espécies desta família com reprodução sexuada podem ser transmitidas de uma planta infectada para uma planta vizinha não infectada (transmissão horizontal). Já algumas espécies do fungo *Epichloë* podem ser transmitidas por ambas as vias (SCHARDL e PHILLIPS, 1997). No Brasil, pela primeira vez, foram isolados microrganismos endofíticos no interior de sementes de erva-mate (PENNA, 2000), porém a maioria das plantas investigadas não possui sementes infectadas por microrganismos endofíticos

A incidência de endófitos e a frequência de infecção variam grandemente de acordo com a espécie hospedeira e a origem geográfica da mesma. WHITE JR., MORGAN-JONES e MORROW (1993), estudando a subfamília Pooideae, verificaram que 30% das espécies abrigavam endófitos em níveis variados de infecção, sendo o fungo *Acremonium* sp. isolado em maior frequência. Este fungo, quando infecta outras subfamílias de gramíneas, constitui-se um potente fitopatógeno. Este fato, segundo os autores, sugere uma relação coevolutiva entre a subfamília Pooideae, e o fungo *Acremonium* sp.. Os autores sugerem uma classificação desse endófito em três categorias, dependendo do grau com que formam estroma (região produtora de conídios e ascósporos) na população desta forrageira. Desta forma, quando estromas são formados em todos os indivíduos infectados, de modo que a reprodução sexual dessas plantas é completamente suprimida, estes endófitos são considerados patógenos

(tipo I) e crescem rapidamente em todos os meios de cultura. Segundo CLAY (1989), estes fungos são agentes potenciais de biocontrole em plantas perenes, podendo inclusive induzi-las a expandirem-se vegetativamente.

Quando estromas são formados em uma fração da população infectada, causando pequena esterilização na população, de forma que o fungo possa ser transmitido pela semente do hospedeiro, estes endófitos pertencem ao tipo II. Endófitos isolados deste tipo de infecção apresentam uma variabilidade considerável na taxa de crescimento. Já os endófitos do tipo III não formam estromas nas plantas infectadas, sendo transmitidos exclusivamente pela penetração no embrião da semente, e crescem vagarosamente em meio de cultura. Segundo WHITE JR., MORGAN-JONES e MORROW (1993), não há qualquer evidência de que este tipo de infecção seja detrimental para a planta, e o endófito neste caso, não pode ser considerado um patógeno. A formação do estroma parece estar relacionada com a capacidade deste fungo em utilizar o açúcar disponível na planta, no momento da formação do estroma.

VIRET e PETRINI (1994), com o auxílio da microscopia de luz e da eletrônica (MEV e MET), detectaram a presença de fungos no interior dos hospedeiros e mostraram a localização e o processo de penetração dos endófitos nas plantas. CLAY (1987) verificou a presença de hifas dos fungos *Acremonium lolli* e *A. coenophialum* (atualmente designado de *Neothyphodium coenophialum*) no espaço intercelular da região meristemática, no mesófilo das folhas, no cerne da inflorescência na semente, mas não encontrou hifas no interior das células. JOHNSON e WHITNEY (1989) também verificaram a presença de hifas no espaço intercelular e aderidas na parede externa de células do parênquima, porém nenhuma hifa no espaço intracelular foi observada. WILSON, CLEMENTE e KAISER (1991) demonstraram a presença de hifas endofíticas em folhas e sementes de cinco espécies de *Lolium*, e WHITE JR. e COLE (1985) observaram o crescimento intracelular de hifas em sementes de *F. arundinaceae* e *F. arizonica*. WHITE JR., MORGAN-JONES e MORROW (1993) usando técnicas de coloração e microscopia ótica, detectaram a presença de micélio no espaço intercelular de folhas, sementes e talos da gramínea *Festuca arundinaceae*.

STONE em 1988 verificou a presença de hifas de *Phyllosticta abientina*,

formando limitada infecção no mesófilo de Douglas fir e *Abies* spp que são originadas de penetração entre células epidérmicas. FISHER et al., (1994) relatou que *Phyllosticta concentrica* coloniza espinhos de *Taxus brevifolia* de forma subcuticular sem colonizar tecidos internos. A colonização de endófitos em outros hospedeiros é muito mais limitada quando comparada à extensa colonização de endófitos clavicipitáceos em gramíneas. Esses fungos endofíticos geralmente causam infecção restrita, e não sistêmica em tecidos saudáveis e são transmitidos a outros hospedeiros por meio de seus esporos. Parece haver predominância de uma ou poucas espécies de fungos em um determinado hospedeiro, mostrando uma reduzida variabilidade na flora micótica, sendo que a composição das espécies pode variar em relação à espécie e distribuição geográfica dos hospedeiros, idade das plantas, condições ecológicas e sazonais, incluindo altitude e precipitação anual (CARROLL e CARROLL, 1978; WILSON, CLEMENTE e KAISER, 1991; AGOSTINI, TIMMER e MITCHELL, 1992; AZEVEDO, 1998).

Segundo WHITE JR. e COLE (1985), a presença de endófitos em gramíneas pode variar dentro de espécies de um mesmo hospedeiro. Nestes hospedeiros também é encontrada uma grande variabilidade genética entre isolados endofíticos da mesma espécie. Tal variabilidade foi encontrada em isolados do fungo *Guignardia citricarpa*, obtidos de plantas cítricas (GLIENKE, 1995), em isolados de banana (LONGO, 1995) e também de milho (RIBEIRO, 1995 e SOUZA, 1996).

Estudando a colonização de folhas de faia (*Fagus sylvatica*) pelo fungo *D. umbrinella*, VIRET e PETRINI (1994) propuseram a existência de duas fases na infecção desse endófito. Inicialmente ocorre a formação de apressório e digestão enzimática da cutícula e das células da epiderme no hospedeiro durante o processo de penetração da hifa. Após a infecção, o fungo permanece latente ao nível subcuticular ou subepidérmico, por um período que pode variar entre 48 horas a vários dias. O endófito coloniza o espaço intercelular do mesófilo, no qual pode formar uma associação neutra e transitória com o hospedeiro. Na segunda fase de infecção, o fungo *D. umbrinella* cresce intracelularmente, podendo formar haustórios, o que geralmente resulta na morte prematura das células infectadas, como já verificado para *R. parkeri*

por STONE (1988). Isso permite, segundo VIRET e PETRINI (1994), diferenciar os fungos endofíticos não clavicipitaceos dos organismos biotróficos verdadeiros (que crescem em outros organismos em íntima associação com seu citoplasma).

Tanto em *D. umbrinella* como em *R. parkeri*, falta a estrutura característica (colarinho) da maioria dos fungos que formam haustórios, o que foi interpretado por STONE (1988), como atestado da natureza transitória da fase biotrófica na simbiose endofítica. Além disso, eles são diferentes dos endófitos sistêmicos de gramíneas, por apresentarem uma distribuição limitada no tecido dos hospedeiro durante a fase endofítica, espalhando-se somente na senescência do hospedeiro ou sob condições de estresse deste. Segundo VIRET e PETRINI (1994) a notável semelhança na penetração do hospedeiro pelos endófitos não clavicipitaceos de diferentes hospedeiros, indica que estes fungos formam um compacto grupo com semelhantes requisitos ecológicos e fisiológicos, o que permite distingui-los claramente dos seus sócias clavicipitaceos.

A presença de fungos endofíticos tem sido demonstrada em trigo, cevada, milho e arroz (FISHER, PETRINI e LAPPIN SCOTT, 1992). Estes autores investigaram as populações de bactérias e de fungos no colmo de milho e também avaliaram a especificidade entre a população de fungos endofíticos e os tecidos da planta, bem como as diferentes sementes usadas no plantio para investigação do potencial de transmissão via semente. Os resultados encontrados indicam que das 23 espécies de fungos isolados, onze têm uma importância relativa, mais de 10% foram isolados do cerne, 13% da epiderme e somente 8% das folhas. O modelo de distribuição quantitativa foi similar no cerne, epiderme e colmo do milho. O maior número de espécies de fungos foi encontrado no cerne, na epiderme e no colmo que nas folhas, talvez devido ao pequeno tamanho da amostra investigada para folhas. Em relação às sementes, não foram encontrados fungos em sementes novas do milho, com um grande contraste na frequência de colonização observada em sementes da colheita usadas para plantio.

MILLER e ROY (1982), estudando a micobiota de folhas, vagens e sementes de soja no Mississippi, isolaram 60 gêneros de fungos durante duas estações de crescimento. A incidência de fungos variou anualmente em parte devido a diferenças

na precipitação. Alguns dos fungos mais frequentemente isolados, em ordem de predominância, foram *Alternaria alternata*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, e *Phoma* spp. de folhas; *D. phaseolorum* var. *sojae*, *A. alternata*, e *Fusarium* spp. de vagens; e *Fusarium* spp.; *D. phaseolorum* var. *sojae*, e *A. alternata* de sementes.

Embora as interações entre vegetais e endófitos, na maioria dos casos ainda não sejam bem esclarecidas, tem sido verificado que os endófitos apresentam uma relação que pode ser mutualística, antagonística ou neutra com o hospedeiro. Em alguns casos foram encontradas interações que levam a um melhor desempenho das plantas com aumento de área foliar e maior número de ramificações, maior tolerância ao ataque de insetos, resistência a doenças e parasitas, resistência a nematóides e antiherbivoria pela produção de toxinas.

FISHER e PETRINI (1990) isolaram *Melanconium apiocarpum* Link e *Cryptosporiopsis* sp., exclusivamente da casca de *Alnus glutinosa*, e não do xilema, sugerindo assim uma especificidade a nível de tecidos. Nestes casos a análise de agrupamentos mostrou que os diferentes órgãos e tecidos das plantas examinadas podiam ser separados com base em seus fungos endofíticos, apoiando a hipótese de CARROLL (1988) de que alguns endófitos têm sofrido coevolução com seus hospedeiros. Esta especificidade só foi demonstrada nos tecidos da parte aérea da planta, pois os fungos isolados das raízes eram habitantes comuns do solo e da rizosfera.

Um exemplo de estrita especificidade entre hospedeiro é o fungo endofítico *R. parkeri* que foi encontrado por CARROLL (1988) somente no “pinheiro Douglas”(Pinaceae) e em nenhuma outra conífera simpátrica na Costa Noroeste dos EUA. Outras observações foram feitas, indicando que alguns fungos são muito seletivos, sendo limitados a um ou poucos hospedeiros intimamente relacionados taxonomicamente (PETRINI e FISHER, 1990 e FISHER e PETRINI, 1990).

PETRINI, STONE e CARROLL (1982) verificaram um padrão de dominância de espécies em que o endófito encontrado com maior frequência em uma determinada espécie vegetal era isolado menos frequentemente de outros hospedeiros. Por outro lado, os endófitos encontrados com menor frequência em uma planta pareciam ser

menos específicos, isto é, eram isolados em um amplo espectro de hospedeiros, mas com baixa frequência.

PEREIRA, AZEVEDO e PETRINI (1993), por exemplo citam os fungos *Colletotrichum* sp. e *Xylaria* sp como endófitos comuns em hospedeiros tropicais, não sendo encontrados nestes um padrão de dominância.

No gênero *Colletotrichum* são encontradas muitas espécies que juntas infectam todas as principais espécies de plantas agrícolas. As espécies deste gênero variam grandemente no espectro de hospedeiros, sendo que algumas causam doenças em uma única espécie vegetal enquanto outras afetam mais do que 50 hospedeiros diferentes.

A infecção latente de plantas por patógenos tem sido reconhecida há muitos anos e é frequentemente considerada como um dos mais altos níveis de parasitismo, uma vez que o hospedeiro e o parasita coexistem com um mínimo dano ao hospedeiro. AGRIOS (1988) definiu infecção latente como o estágio em que um hospedeiro é infectado com um patógeno mas não apresenta sintomas de doença, e persiste até que sinais ou sintomas apareçam por condições nutricionais ou pelo estágio de maturidade do hospedeiro ou do patógeno (CERKAUSKAS, 1988; AGOSTINI, TIMMER E MITCHELL, 1992; VIRET e PETRINI, 1994).

CARROLL (1988) afirmou que, na agricultura, a distinção entre patógenos latentes e certos endófitos é confusa. Os fungos que causam infecções latentes são responsáveis por podridão e perda da produção pós-colheita. Muitos patógenos de folhas, que infectam o hospedeiro logo que as folhas emergem, somente irão causar lesões meses mais tarde. O equilíbrio entre endófitos e hospedeiros pode ser rompido com o intensivo uso de defensivos agrícolas, favorecendo determinados endófitos a se tornarem possíveis patógenos.

Segundo SINCLAIR (1991), a infecção latente pode ser reconhecida como um tipo de tolerância ou resistência a certos patógenos, onde o parasita encontra o ambiente impróprio para crescimento e multiplicação, e resulta de um processo de coevolução entre plantas e patógenos. Tal coevolução permitiria a maior acumulação de resistência e aptidão gênica no hospedeiro a vários parasitas, onde a alta susceptibilidade individual de plantas e a alta virulência dos patógenos seriam

eliminadas no início do processo evolutivo. Este tipo de infecção é importante na epidemiologia, controle de doenças de plantas e também na obtenção de resistência ou tolerância a um patógeno.

Segundo RODRIGUEZ e REDMAN (1997), fungos endofíticos não induzem sintomas significativos de doença mas mantêm os mecanismos bioquímicos e genéticos necessários para a infecção e a colonização de plantas hospedeiras. Segundo os autores, há quatro classes de fungos endofíticos de acordo com o comportamento no tecido vegetal: 1) fungos que crescem ativamente no tecido do hospedeiro, resultando em extensa colonização (WHITE JR. e MORROW, 1990); 2) fungos que crescem ativamente no hospedeiro mas apenas colonizam áreas limitadas do tecido vegetal; 3) fungos que crescem muito mal no hospedeiro, em função de respostas destes, ficando quiescentes até a senescência do hospedeiro; 4) fungos que crescem muito mal no hospedeiro, mas permanecem metabolicamente ativos.

Rotineiramente a identificação de fungos endofíticos envolve esterilização superficial de tecidos hospedeiros. Porém, isto não define a extensão de colonização do tecido ou a atividade metabólica do endófito. Independente do tipo de classe, qualquer endófito pode manter suas bases bioquímicas e genéticas necessárias para infectar tecidos vegetais. A principal diferença entre classes é que o fungo que coloniza extensivamente o hospedeiro evita ou é imune ao sistema de defesa da planta. Assim, tais fungos são funcionalmente equivalentes aos patógenos com interação compatível com o hospedeiro (que desenvolvem a doença) mas não induzem sintomas de doença. Por outro lado, os tipos 3 e 4 são idênticos funcionalmente aos patógenos que mantêm uma interação incompatível com o hospedeiro (RODRIGUEZ e REDMAN, 1997).

Diversas espécies de *Colletotrichum* sp. são consideradas patógenos latentes porque induzem lesões em tecidos vegetais senescentes. É possível que os patógenos latentes estejam atualmente em estágios evolutivos transitórios entre patógenos virulentos e aqueles endófitos ou saprófitos. Por outro lado, patógenos latentes podem ser saprófitos sofisticados que desenvolveram um mecanismo para evitar competição no solo, colonizando parcialmente tecidos vegetais antes da senescência do

hospedeiro. Na verdade, a colonização restrita do hospedeiro antes da senescência deste pode ter pouco ou nenhum impacto no desempenho do hospedeiro. Este tipo de interação pode favorecer significativamente o patógeno latente na competição com fungos saprofitos que são incapazes de colonizar tecidos vegetais não senescentes.

Em gramíneas, algumas vezes a patogenicidade está relacionada com a fase sexual de fungos pertencentes à família Clavicipitaceae. Neste caso, SINCLAIR propôs em 1991, o termo endófito clavicipitáceo anamorfo, para o fungo mutualista, e endófito clavicipitáceo teleomorfo para o patogênico. Na gramínea *Festuca arundinaceae* var. *genuina* Scheb., BACON et al. (1977) encontraram um fungo endofítico muito semelhante ao patógeno *Epiclhoë typhina*. STONE (1986) relatou que na "pior das hipóteses" os endófitos são parasitas fracos que ocorrem naturalmente em tecidos senilizados, citando como exemplo *Phomopsis sojae* Lehm., encontrado em tecidos sadios de *Glycine max*.

Alguns fungos são capazes de expressar todos os estilos de vida, como por exemplo *Colletotrichum* sp. *magna*. Tal espécie é patogênica em variedades de curcubitáceas, mas é saprofítica em material vegetal e endofítica em tomate (FREEMAN e RODRIGUEZ, 1993).

Sendo assim, quando microrganismos endofíticos são isolados, pode-se estar isolando também patógenos latentes destes hospedeiros. Segundo AZEVEDO (1998), é muito difícil estabelecer um limite entre microrganismos endofíticos e patogênicos latentes, porque muitos endófitos são estreitamente relacionados com patógenos. Tal situação foi relatada por GLIENKE (1995) que isolou a forma endofítica do fungo *Guignardia citricarpa*, conhecido como patógeno de citros e também detectou a existência de duas populações geneticamente diferentes (BLANCO, 1999).

#### 2.1.3.1 Endófitos e controle biológico de insetos

No início da década de 80 começaram a surgir na literatura especializada, casos evidenciando o importante papel desempenhado pelos microrganismos endofíticos, no caso fungos, sobre suas plantas hospedeiras. Foi demonstrado que a existência de um

ou mais desses microrganismos podia ocasionar à redução do ataque de insetos nos seus hospedeiros vegetais. Relatos pioneiros sobre o assunto começaram a surgir a partir de 1981. Nessa fase, de 1981 até 1985, que já pode ser considerada histórica dentro da área, demonstrou-se a existência de uma proteção nas plantas contra insetos herbívoros, ocasionada por microrganismos endofíticos. Começaram a ser pesquisadas, também, as causas dessa proteção e as variáveis envolvidas no processo.

WEBBER (1981) foi talvez o primeiro a relatar um exemplo de proteção vegetal por fungo endofítico, demonstrando que o endófito *Phomopsis oblonga* protegia plantas de olmeiro contra besouros da espécie *Physocnemum brevilineum*. Essa proteção, por sua vez, evitava a transmissão de fitopatógenos, pois o inseto atuava como vetor do fungo *Ceratocystis ulmi*, que causa doença em olmeiro. O autor associou os efeitos no inseto-praga a compostos tóxicos produzidos pelo fungo endofítico, o que foi comprovado anos mais tarde por CLAYDON, GROVE e POPLE (1985), que também mostraram que endófitos da família *Xylariaceae* são produtores de metabólitos secundários que afetam larvas do besouro, em hospedeiros vegetais do gênero *Fagus*.

FUNK et al. (1983) observaram fungos protegendo a gramínea de clima temperado azevém ou raigrás (*Lolium perenne*) contra lagartas de gramados; entretanto, GAYNOR e HUNT (1983), mostraram que, em várias espécies dessa mesma gramínea, o ataque por larvas do inseto *Listronotus bonariensis* é maior em plantas com altos níveis de interação por fungos endofíticos. Esses últimos autores mostraram também que essas associações podem ser complexas, pois níveis de fertilização nitrogenada no solo afetam a incidência de ataque de insetos. Com os mesmos insetos e plantas, na Nova Zelândia, BARKER et al. (1984) e PRESTIDGE, ZIPP e BADAN (1984) evidenciaram que plantas que não possuíam fungos endofíticos do gênero *Acremonium* (atualmente classificado como pertencente ao gênero *Neotyphodium*), eram severamente atacadas.

LASOTA, WALDVOGEL e SHETLAR (1983) já haviam correlacionado na planta *Picea glauca* (uma espécie de pinheiro) a mortalidade do inseto homóptero da espécie *Adelgis abietis*, com a infecção das galhas pelo fungo endofítico *Cladosporium*

*sphaerosperum*.

Em gramíneas como *L. perenne* e também em ciperáceas do gênero *Cyperus*, ganho de peso e sobrevivência do inseto-praga *Spodoptera frugiperda* foram afetados por fungos endofíticos, como *Balansia cyperi* (CLAY, HARDY e HAMMOND, 1985 a; 1985 b; HARDY, CLAY e HAMMOND, 1985). Estudos com relação a esse inseto afetando diferentes espécies de *Lolium* foram também conduzidos por LATCH, HUNT e MUSGRAVE (1985b) com dois fungos endofíticos: o *Acremonium lolii* e outro gênero *Gliocadium*; os autores discutem os benefícios e riscos decorrentes do aumento de produção dessas toxinas no controle de insetos e danos sobre animais domésticos que se alimentam dessas plantas. Foi verificado que *Acremonium* também afetava afídeos nas gramíneas forrageiras dos gêneros *Lolium* e *Festuca* (LATCH, CHRISTENSEN e GAYNOR, 1985a).

AHMAD et al. (1985) verificaram efeitos semelhantes do mesmo fungo no grilo *Acheta domesticus* JOHNSON et al. (1985) em testes de escolha com plantas infectadas ou não com endófitos, mostraram em *Festuca* que os insetos eram como que repelidos por plantas infectadas. CARROLL (1986), BREEN (1993a, 1993b) e CARROLL (1995), descreveram o fungo endofítico *Rhabdocline parkeri*, que é o mais freqüente em abeto ou Pinheiro de Douglas, como controlador de galhas causadas por larvas de insetos do gênero *Contarinia*; nesse caso o controle era feito por toxinas produzidas pelo fungo, atuando no inseto-praga.

AHMAD et al. (1986) mostraram que *Sphenophorus parvulus* era menos incidente em plantas que apresentavam fungos endofíticos. Também AHMAD et al., (1987) verificaram a mesma situação em gramíneas atacadas pelo inseto *Spodoptera eridania*. SAHA et al. (1987) estudando endófitos de plantas do gênero *Festuca*, verificaram que os do gênero *Acremonium* estavam associados com resistência de seus hospedeiros ao percevejo das gramíneas (*Blissus leucopterus hirtus*) e o mesmo foi encontrado por MATHIAS, RATXCLIFFE e HELMAN (1990) em *L. perenne*, resistente graças ao endófito *Acremonium lolii*. Já KINDLER, BREEN e SPRINGER (1990), verificaram que *Acremonium* reduziu o ataque do afídeo *Diuraphis noxia* tanto em *Lolium* como em *Festuca* e o mesmo foi verificado por CLEMENT et al. (1990,

1992), que utilizaram também testes de laboratório.

Também em relação aos cercopídeos, a planta hospedeira *F. arundinaceae*, portadora do fungo endofítico *A. coenophialum*, se mostrou mais resistente que plantas sem este endófito, principalmente em plantas em idade de alta incidência dos insetos (MUEGGE et al., 1991). Da mesma forma, EICHENSER e DAHLMAN (1992) verificaram menores taxas de sobrevivência e de reprodução do afídio *Rhopalosiphum padi* em *F. arundinacea* infectada com o endófito *A. coenophialum*, quando comparada com plantas livres. Segundo estes autores a alta incidência do afídio em plantas pode ser uma indicação de que elas não possuem endófitos produtores de alcalóides.

KANDA et al. (1994) relataram a preferência de larvas de *Parapediasia teterrella* para dietas com plantas de *L. perenne* e *F. arundinacea* não infectadas, a ponto das larvas definharem e morrerem de fome se mantidas em dieta com plantas infectadas com *Acremonium*. No campo, parcelas da espécie sem o endófito foram severamente atacadas em contraste com plantas com *Acremonium*, que praticamente ficaram isentas de larvas do inseto.

Segundo CLAY (1988) vários fungos endofíticos (Clavicipitaceae, Ascomycetes), produzem alcalóides em seus hospedeiros vegetais, reduzindo a sobrevivência e o desenvolvimento de larvas de *S. frugiperda* em muitas gramíneas e ciperáceas.

Extratos alcóolicos de gramíneas *Poa ampla* com e sem *Neotyphodium typhinum* foram testados contra larvas de mosquitos; só o extrato de plantas infectadas com o endófito era ativo contra as larvas, mas o extrato do próprio fungo, sem desenvolvimento na planta, não apresentava atividade (JU et al., 1998).

CARROLL (1986) e WEBBER (1981) sugeriram que o fungo endofítico *P. oblonga* deve ser responsável pela pouca disseminação de doença do olmeiro causada por *Ceratocystis ulmi* e transmitida por besouros que, por sua vez, são controlados pelo endófito. Da mesma forma, SHERWOOD-PIKE et al. (1986) relataram no Pinheiro de Douglas a atuação do fungo endofítico *Rhabdocline parkeri* sobre o inseto *Contarinia* sp. e PETRINI, PETRINI e LAFLAME (1989) verificaram em *Abies*

*balsamea*, em Quebec, Canadá, que os fungos endofíticos *Phyllosticta* sp. e *Hormonema dematioides* colonizavam galhas do inseto cecidomídeo *Paradiplosis tumifex*, sugerindo que esses fungos poderiam ser utilizados no controle da praga. Também em pináceas, JOHNSON e WHITNEY (1994), verificaram que, de 100 isolados de hifas e extratos de hifas de folhas do pinheiro *Picea mariana*, 21 deles tinham efeitos tóxicos sobre o inseto *Choristoneura fumiferana*, sendo que os isolados de folhas maduras eram mais efetivos em culturas de células do que os de folhas jovens. O peso seco e o desenvolvimento de larvas alimentadas com extratos de hifas foram também estudados.

Há casos de neutralidade ou até mesmo de favorecimento dos insetos em plantas portadoras de microrganismos endofíticos. Em 1986, KIRFMAN, BRADENBURG e GARNER estudaram a relação entre incidência de endófitos e ataque de insetos em *F. arundinacea*, no Missouri. Alguns cicadelídeos e o crisomelídeo *Chaetocnema pulicardia* decresceram em número com o aumento de microrganismos. Entretanto, houve um aumento da incidência de um cicadelídeo (*Exiantus exitiosus*) e de um inseto do gênero *Bruchomorfa* com aumento de endófitos. Os autores sugerem que a eliminação de endófitos tóxicos em pastagens pode causar desequilíbrios biológicos com incremento de incidência de alguns inseto-praga e diminuição de outros. BREEN (1993a; 1993b) realizou um amplo estudo com endófitos do gênero *Acremonium* em várias espécies de gramíneas, como festucas e em *L. perenne*, com relação ao ataque de três espécies de afídios, e também com duas espécies de lepidópteros, a *S. frugiperda* e *S. eridania*. Embora, na maioria dos ensaios realizados, fosse constatada uma diminuição na sobrevivência dos insetos, cada caso foi considerado diferente do outro, sugerindo que o genótipo da planta, o endófito e os insetos têm que ser analisados um a um, pois, dependendo das condições, pode ou não haver controle ou mesmo ocorrem efeitos contrários, como o aumento da incidência da praga na presença do endófito.

Em carvalho, estudos realizados durante um período de quatro anos mostraram que existem diferenças sazonais com relação à presença de endófitos. Nesse caso, a incidência do lepidóptero *Cameraria* sp., um minador de folhas, não foi alterada pelo

endófito, e até em alguns casos houve maior incidência da praga coincidindo com o aumento de endófitos, sugerindo que os insetos minadores de folhas facilitam a instalação e o incremento de fungos endofíticos. Também não houve preferência de qualquer oviposição por parte de fêmeas do inseto, que colocaram ovos igualmente em folhas com ou sem o fungo (FAETH e HAMMONN, 1996; 1997 a ).

Em carvalho, experimentos realizados sobre os efeitos do endófito *Asteromella* sp. em insetos não detectaram diferenças entre o tempo de sobrevivência e tamanho das larvas provenientes de ramos com ou sem o fungo. Além de *Asteromella*, outros endófitos, como *Plectrophomella* sp. e uma levedura filamentosa foram também estudados e, nesses casos, larvas do inseto em folhas em que foram inoculados dois destes endófitos desenvolveram-se mais lentamente (FAETH e HAMMONN, 1996; 1997 a ; 1997 b).

MURPHY, SUN e BETTS (1993) pesquisaram em *F. arundinacea* a influência de fungos endofíticos em relação ao ataque por espécies de insetos do gênero *Sphenophorus*, que reduziram a cobertura de gramados em até 25%, em plantas livres de endófitos. LEWIS e CLEMENT (1986), não verificaram efeitos no aumento de resistência a larvas de moscas das frutas (*Oscinella* spp) em gramíneas, com ou sem endófitos.

LEWIS e VAUGHAM (1997) observaram que a pequena quantidade de alcalóides que se acumulou nas plantas hospedeiras pode explicar a inexistência de diferenças entre peso, sobrevivência de larvas e emergência de adultos em insetos alimentando-se de plantas com e sem endófitos, estes resultados foram obtidos a partir de larvas de *Tipula* spp. alimentadas com *L. perenne* com e sem o fungo endofítico *Neotyphodium lolii*.

CLEMENT et al. (1997) relataram que de quatro linhagens de cevada selvagem com e sem o endofítico *Neotyphodium*, a densidade do afídio *Diuraphis noxia* se mostrou menor entre as duas linhagens que não continham o endófito, porém sem diferença significativa nas outras duas linhagens. Da mesma forma TIBBETS e FAETH (1999) estudaram os efeitos de *Neotyphodium* introduzindo-o em dois tipos de festuca, a comum e a do Arizona, e estudaram seus efeitos em formigas cortadeiras da

espécie *Acromyrmex versicolor*. Experimentos foram realizados com possibilidade de escolha, pelas formigas, de plantas infestadas ou não infestadas. Também foram realizados ensaios oferecendo aos insetos apenas plantas infectadas com o endófito, para verificar efeitos na sobrevivência e no desenvolvimento das pragas. Em experimentos com escolha, houve preferência dos insetos pelas gramíneas não infectadas, no caso de *F. arundinacea* como hospedeira, mas não houve preferência no caso de festuca do Arizona. Já com experimentos sem escolha, as rainhas não sobreviveram após semanas, quando submetidas à dieta com plantas infectadas. Os efeitos, entretanto, foram muito variáveis e dependentes do genótipo do fungo e do hospedeiro, além de fatores do ambiente (TIBBETS e FAETH 1999).

WILSON e CARROLL (1997) investigaram um sistema no qual se sabe que o fungo endofítico causa mortalidade em um inseto que forma galhas, o *Besbicus mirabilis*, mas não no outro, o *Bassetia ligni*, ambos atacando folhas do mesmo vegetal. Foi verificado que o *Besbicus mirabilis* evita a parte da folha em que o endofítico ocorre mais freqüentemente. Já o *Bassetia ligni* ocupa a lâmina da folha em que o endófito não tem atividade; a emergência das galhas só se dá quando o fungo vai atingir o pico de infecção, de tal forma que não ocorre contato prolongado com o fungo. Os autores concluem que a simples observação da presença ou ausência de insetos em hospedeiros pode levar a enganos quando se investiga o papel de fungos endofíticos no controle de inseto-praga.

CARROLL (1995) questiona, em revisão sobre endófitos de essências florestais, a maioria dos trabalhos sobre o efeito dos fungos endofíticos atenuado mutualisticamente no controle de insetos herbívoros. Segundo ele, para que haja provas convincentes desses efeitos, há necessidade de se mostrar que o fungo está nos tecidos em que o inseto preferencialmente não ataca a planta; deve ser constatada, também, uma correlação entre a presença de endófitos e diminuição de herbivoria ou morte de insetos e, finalmente, devem ser comparadas plantas inoculadas com endófito e não inoculadas e o destino dos insetos nos dois casos. CARROLL (1995) também salienta que é importante a comprovação de que o fungo produz toxinas. Na maioria dos trabalhos realizados nesse sentido, uma ou mais, mas não todas as provas

mencionadas acima existem. Além disso, o autor menciona o fato de que os dados são obtidos com um inseto, um endófito e um hospedeiro, quando na natureza, o problema é muito mais complexo, envolvendo uma ampla interação entre endófitos, entre diversos herbívoros e interações entre o hospedeiro e as plantas no ambiente. Outros empecilhos salientados por CARROLL (1995) são a dificuldade de inoculações de endófitos com sucesso e a não comprovação de produção de toxinas de endófitos florestais *in vivo*, embora elas tenham sido isoladas de culturas puras de fungos endofíticos. Finalmente, CARROLL (1995) salienta o fator coevolução considerando as interações entre planta-endófito-inseto; os três têm longa história evolucionária e, segundo o autor, devem conviver harmoniosamente, a não ser em condições não-usuais ou artificiais. Porém, deve-se salientar que as condições da agricultura são, por si só, extremamente artificiais. Isso minimiza a importância do fator coevolução, pois em condições novas as interações podem se modificar. Assim, o uso de agroquímicos, variações climáticas, condições do solo e práticas culturais tornam as interações entre os três componentes endófito-hospedeiro-inseto pouco previsíveis.

Em relação ao controle de insetos pelos fungos endofíticos, BACON et al. (1977) foram os primeiros a estabelecer uma correlação entre a presença de um fungo endofítico, o *Epichloë typhina*, e a toxicidade que seu hospedeiro, a *F. aundinacea*, apresentava aos mamíferos domésticos herbívoros que se alimentavam da gramínea. Atualmente, é conhecido o fato de que várias toxinas são produzidas por fungos endofíticos e são elas que protegem a planta contra herbívoros, sejam eles mamíferos, insetos ou outros animais. Em revisão de BACON e HILLS (1996), foram descritas as principais toxinas, como os alcalóides de ergot de dois tipos, ergopeptina e clavina e as neurotoxinas chamadas comumente de lolitrems, isoladas de *L. perenne*. Em oposição aos ergot, que são toxinas isoladas diretamente dos fungos endofíticos, as neurotoxinas produzidas por endófitos como *A. lolii* são apenas precursoras de toxinas, como por exemplo a paxilina. Não se sabe se esse precursor é convertido pela planta em lolitrems ou se o fungo não o sintetiza em cultura pura, mas torna-se capaz de síntese quando no interior da planta.

MILLER (1986) apresenta pesquisa na qual o Pinheiro do Canadá é protegido

contra insetos pela produção, no interior do vegetal, de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos, que são tóxicos aos insetos. Em 1988, PRESTIDGE e GALLAGER estabeleceram relações entre a presença de um fungo endofítico, *A. lolii* e o crescimento, a sobrevivência e o comportamento alimentar de larvas do curculionídeo *L. bonariensis* no hospedeiro de *L. perenne*. Nesse caso, a redução do ataque de insetos em plantas portadoras do endófito foi relacionada com uma possante toxina contra mamíferos, a lolitrem B. Esta, adicionada à dieta de insetos em ensaio de laboratório reduziu o seu crescimento e a sua sobrevivência. A toxina atua por ingestão, mas não por absorção pelo tegumento do inseto.

Em determinados casos, a produção de toxinas por fungos foi a explicação plausível encontrada para certos casos observados de controle natural de insetos. Assim, CLARK, MILLER e WHITNEY (1989) mostraram em *Abies balsamea* e *Picea rubens*, que de 900 amostras de isolados de fungos, cinco delas produziam compostos tóxicos das quais três eram potentes toxinas que, extraídas e adicionadas a insetos, causavam a morte e redução da taxa de desenvolvimento do lepidóptero da família Tortricidae *C. fumiferana*. Este depois de ataques a plantações em New Brunswick, Estados Unidos, começou a apresentar uma alta taxa de mortalidade, que poderia ter sido causada por toxinas de fungos endofíticos produzidas em plantas hospedeiras.

SIEGEL et al. (1990) verificaram a presença dos alcalóides N-formil e N-acetil lolina, peramina, lolitrem B e ergovalina e a resposta das plantas contendo estes alcalóides frente aos afídios. Os vegetais pesquisados foram várias gramíneas infectadas com os endófitos *Acremonium* spp. e *E. typhina*. Estes geralmente produzem alcalóides, principalmente peramina e ergovalina. Peramina, lolitrem B e ergovalina foram encontrados em *Lolium* e *Festuca* infectados com *A. coenophialum* e *A. lolii* em *Festuca longiflora* infectado com *E. typhina*. Os insetos das espécies *Rhopalosiphum padi* e *Schizaphis graminum* não sobreviveram em gramíneas com alcalóides do tipo lolina. Por outro lado, a ergovalina não afetou as duas espécies de insetos.

Os extratos metanólicos de *F. arundinacea*, infectada por *A. coenophialum*,

contêm lolinas produzidas pelo fungo. Essas lolinas são capazes de alterar o comportamento alimentar e peso de insetos-praga da planta. Dietas nas quais foi incorporado o extrato com derivados do alcalóide lolina produziram efeitos em *S. frugiperda* e *O. nubilalis*, reduzindo o peso e alterando o comportamento, especialmente no primeiro inseto (RIEDEL et al., 1991).

PATTERSON, POTTER e FANNIN (1992) observaram tanto em *Lolium* como *Festuca*, o papel do endófito *Acremonium* na redução do ataque do besouro japonês *Popilla japonica*, devido à produção de alcalóides nas plantas pelo fungo endofítico. Em outras observações, surge a constatação de que alterações no ambiente podem afetar a produção de toxinas pelos fungos endofíticos. BREEN (1992) verificou que alterações na temperatura e mudanças na estação modificam concentrações de toxinas nas plantas, como é o caso da peramina produzida em *L. perenne*, infectado com *A. lolii*. Dessa maneira, como a antixenose em relação ao afídio *S. graminum*, é dependente de peramina e da concentração de endófitos, uma decorrência natural é de que também se alterem os efeitos sobre o inseto-praga. A existência de especificidade entre certos fungos endofíticos e plantas hospedeiras levou LEUCHTMANN (1992) a sugerir um estudo mais aprofundado da ocorrência de raças fisiológicas em fungos endofíticos que seriam importantes em futuros estudos, visando a um controle biológico de insetos utilizando endófitos.

Pesquisas têm sido realizadas visando obter novas toxinas úteis no controle de insetos. Duas novas toxinas ativas contra *C. fumiferana* foram encontradas em um fungo endofítico não classificado, no hospedeiro *Gaultheria procumbens* (FINDLAY et al., 1997). Alcalóides de *N. lolii* em *L. perenne* são capazes de alterar o comportamento de insetos. Foram ensaiados vários destes alcalóides introduzidos em dietas de adultos do inseto *Heteronychus aratur*, um coleóptero. Peramina, lolitrem B, alcalóides do tipo lysergol, festuclavina e ácido lisérgico também não causaram efeitos em adultos do inseto. Ergovina causou efeitos moderados, mas ergotamina e ergovalina da família dos alcalóides do tipo ergot parecem ser os principais responsáveis pela resistência do hospedeiro *L. perenne* ao coleóptero (BALL et al., 1997b).

Recentemente, MILES et al. (1998) mostraram que isolados endofíticos de *Neotyphodium* sp. produzem N-formilonina e um análogo de paxilina no hospedeiro *Echinopogum ovatus*. Esses compostos apresentam atividade anti-inseticida contra *L. bonariensis* e outros insetos.

A maioria dos trabalhos relacionados com produção de toxinas tem sido realizada com gramíneas, entretanto CALHOUN et al. (1992) pela primeira vez identificaram produtos tóxicos de fungos endofíticos em plantas lenhosas que eram capazes de alterar a taxa de crescimento e mortalidade em larvas de *C. fumiferana*, atacando o pinheiro bálsamo. Os endófitos foram *Phyllosticta* e *Hormonema dematioides* e os compostos foram principalmente ácido heptelídico e rugulosina. BILLS et al. (1992) também detectaram em uma lenhosa tropical, infectada com um fungo endofítico do gênero *Phomopsis*, a existência de toxinas tremorgênicas.

Em certos vegetais, a produção de toxinas não é unicamente função existente nos fungos endofíticos. Há uma interação fungo-planta afetando essa produção e toxinas podem ser formadas e se espalhar pelo hospedeiro. Isso evidentemente pode ocasionar um controle de insetos, mesmo na ausência de um endófito no local de ataque da praga. O desenvolvimento e a nutrição de larvas da mariposa *Plutella xylostella* foram estudados em brassicas, em laboratório. As larvas foram afetadas por ingestão de folhas antes que o fungo endofítico *Acremonium alternatum* atingisse essas folhas. Houve também diferenças na eficiência da utilização de alimentos por fêmeas e machos do inseto. Os resultados devem estar relacionados com o metabolismo de fitoesterol nas plantas e indicam que fungos endofíticos que existem no solo podem, mesmo por meio de uma tênue interação, influir nas relações entre insetos e plantas (RAPS e VIDAL,1998). Além disso, níveis de alcalóides e outras toxinas podem ser alterados não só quantitativamente como qualitativamente, de acordo com o estado fisiológico da planta. Como os fungos endofíticos são importantes no controle de insetos, mas também podem causar, pela produção de alcalóides e micotoxinas, problemas no gado que se alimenta das plantas que os contêm, foi feito um estudo em *L. perenne* infectado por *N. lolii* que produz o alcalóide peramina, o mais importante no controle da praga *L. bonariensis*. Foi

verificado em oito diferentes associações de fungo-planta que, com a idade, a quantidade de peramina decresce nas folhas e na fase de inflorescência das plantas, a peramina atinge seus níveis de concentração mais baixos (BALL et al., 1997 a). Outras interações aparentemente simples podem ocorrer; *E. typhina* produz estromas em colmos de plantas hospedeiras, o que ocasiona um aumento da transpiração pelos estromas. Essa alteração reduz o ataque por insetos herbívoros (WHITE JR., GLENN e CHANDLER, 1993).

A expressão da resistência aos insetos pode ser afetada por diversos fatores, como quantidade de aleloquímicos presentes, genótipo da planta (BREEN, 1992, 1993 a; 1993 b), fertilidade do solo e genótipo dos endófitos (BACON, 1988; BREEN, 1992; CHRISTENSEN, LATCH e TAPPER, 1991). Falta de água, temperatura, pH do solo, resistência dos insetos-praga e outros fatores podem afetar a quantidade de endófitos e a concentração de toxinas. BREEN (1994) idealizou um esquema com todas estas interações afetando a redução ou o aumento de resistência das plantas aos insetos-praga na presença de endófitos. Desta maneira, como já mencionado, em cada caso e situação podem ser encontrados resultados diversos. Algumas generalizações, entretanto, podem ser feitas, como por exemplo: o efeito dos endofíticos no controle de insetos é mais efetivo em pragas que se alimentam de folhas; outra generalização é que os resultados conseguidos com *L. perenne* são mais variáveis do que os obtidos em *Festuca*, pois esta tem menos variabilidade que a primeira. Por exemplo, com relação a *F. arundiancea* e outras gramíneas, estudos com plantas sem e com *A. coenophialum* investigadas com relação ao ataque de dois coleópteros revelaram, em ambos os casos, que o ataque foi menor em *F. arundinacea* nos primeiros instares do inseto, mas depois houve bastante variação, indicando que existem muitos fatores que atuam no controle (POTTER, PATTERSON e REDMOND, 1992).

Com relação a alterações devidas aos nutrientes presentes no solo, especialmente fertilizantes nitrogenados, existem estudos que mostram que essas interações ocorrem e são bastante significativas. ARECHAVALETA et al., (1989) já havia verificado que no endófito *A. coenophialum* de *F. arundinacea* a produção dos alcalóides do tipo ergopeptídeos aumenta com a presença de fertilizantes nitrogenados

no solo e estresse hídrico moderado, o que conseqüentemente altera o controle de insetos-praga.

Um estudo sobre a interação entre fertilização nitrogenada, pragas e o fungo endofítico *A. coenophialum* mostrou de modo geral, que insetos como *S. frugiperda* desenvolvem-se melhor em plantas com fertilizantes nitrogenados sem o endófito. Entretanto, considerando este e outros insetos, a presença do fungo *A. coenophialum* impede o seu desenvolvimento. Os resultados são bastante variáveis e não permitem estabelecer uma correlação que funcione em todos os casos, entre fertilizantes nitrogenados e endófitos atuando nas pragas de *F. arundianacea* (DAVIDSON e POTTER, 1995). Da mesma forma, BULTMAN e CONARD (1998) verificaram a interação entre diversos fatores, como nível de nutrientes, danos causados à planta hospedeira *F. arundianacea* e presença de fungos endofíticos no controle de *S. frugiperda*. A massa pupal do inseto foi negativamente influenciada pelo endófito em baixa quantidade de nutrientes, mas o efeito se mostrou negligenciável em plantas com altos níveis de aplicação de fertilizantes. De qualquer forma, o estudo mostrou que as interações são complexas e influenciadas por vários fatores, inclusive pela aplicação de fertilizantes.

Estudos mais recentes, em condições de cultivo em hidroponia foram realizados por RICHARDSON et al. (1999). Os autores verificaram que em *F. rubra* subsp. *commutata* cultivada no sistema de hidroponia haviam diferenças quando um endófito estava presente ou não, com relação a acúmulo de produtos alcalóides e em presença de diferentes quantidades e tipos de fontes de nitrogênio. Conforme um ou outro caso, houve maior ou menor produção dos alcalóides ergovalina e peramina em plantas com endófitos, o que potencialmente deve alterar a sua resistência a insetos.

CLAY (1996), em estudo sobre alterações no ambiente em plantas com endófitos clavicipitáceos que produzem alcalóides, faz considerações sobre interações planta-endófito-herbívoros com insetos, mostrando que a presença do fungo pode auxiliar a competição entre o hospedeiro e outras plantas, afetando assim a estrutura e dinâmica das comunidades vegetais.

Outros tipos de interações, como a presença de gramíneas principalmente

*Festuca* ou *Lolium*, dentre outras presentes no ambiente, além de alterações decorrentes dessas interações com relação ao ataque de insetos e presença de fungos endófitos, praticamente não haviam sido levadas em consideração até que CLAY, MARKS e CHEPLICK (1993) realizaram pesquisas nesse sentido. Esses autores verificaram efeitos de espécies de fungos endofíticos do gênero *Acremonium* em relação ao ataque por larvas de *S. frugiperda* em *F. arundinacea* e *F. rubra*, cultivadas isoladamente ou misturadas com outras gramíneas. Em geral, o ataque de insetos foi menor em hospedeiros com endófitos, pois as plantas eram menos preferidas pelas pragas; ocorreram, entretanto, diferentes graus de ataque de insetos, de acordo com as associações de vegetais presentes. Esses estudos demonstram que interações entre plantas alteram os efeitos de fungos endofíticos com relação ao controle de insetos.

#### 2.1.3.2 Fungos endofíticos entomopatogênicos

A possibilidade do uso dirigido de fungos endofíticos no controle de insetos, salienta que o biocontrole pode ser potencializado por inoculação artificial (CLAY, 1989), cujas técnicas iniciadas por LATCH e CHRISTENSEN (1985) e depois por LEUCHTMAN e CLAY (1988) facilitaram o emprego desse controle biológico de insetos.

Como fungos endofíticos principalmente os do gênero *Acremonium*, são controladores de alguns insetos-praga, é importante saber se eles podem ser inoculados em plantas livres de endófitos e transmitir a elas a capacidade de se tornarem resistentes a certas pragas. Foi o que fizeram com sucesso KOGA et al. (1997), transferindo o endófito *Acremonium* para *F. arundinacea* e *L. perenne*. Conseguiram, assim transmitir via semente a capacidade dessas plantas controlarem o inseto *Parapediasia teterrella*.

Da mesma forma, PEREIRA, VIEIRA e AZEVEDO (1999) em bananeira, inocularam artificialmente fungos endofíticos com marcadores genéticos de resistência a determinados fungicidas e verificaram que não apenas a inoculação era eficiente como também os fungos apresentavam condições de competição com outros não

mutados. Isso demonstra que a inoculação de linhagens de valor no controle biológico poderá não apenas ser praticada com sucesso, mas que o microrganismo modificado, uma vez inoculado poderá manter-se no hospedeiro, podendo coexistir e até superar linhagens selvagens da mesma espécie.

Um ponto importante, pelo menos em gramíneas, reside no fato de que várias espécies de fungos podem ser transferidas por meio de sementes, o que torna o biocontrole praticamente “hereditário”, capaz de passar para os descendentes. Existem trabalhos que mostram a importância de fungos endofíticos presentes em sementes, no controle de insetos. KNOCH, FAETH e ARNOTT, em 1993, verificaram em *F. arundinacea*, na qual fungos endofíticos como *A. coenophialum* são transmitidos via semente, que as formigas, na maioria dos casos, preferem coletar sementes livres de fungos, evitando aquelas que são portadoras de microrganismos endofíticos. Mesmo sementes coletadas com fungos são depois desprezadas, o que favorece a sua dispersão e germinação.

Fungos entomopatogênicos podem ser colocados nas plantas. Esse procedimento foi feito em milho (BING e LEWIS, 1991; 1992a; 1992b) para verificar a possibilidade de ao atuar como um endofítico, o fungo ser capaz de controlar o inseto da broca européia do milho (*Ostrinia nubilalis*). *Beauveria bassiana* foi inoculada por injeção e por aspersão foliar e foi detectada como endofítico, colonizando várias partes da planta e impedindo o ataque da lagarta em alguns estágios de seu crescimento. Das plantas injetadas com *B. bassiana*, 95% foram colonizadas pelo fungo e 98,3% das aspergidas também o foram. Um importante achado foi o de que em 33% das plantas não tratadas foi encontrado o fungo, indicando que a colonização ocorre também naturalmente. Os autores não determinaram o processo de como *B. bassiana* penetra no vegetal, mas sugeriram que a movimentação no interior da planta é passiva, ocorrendo no seu sistema vascular. Também mostraram que não é o inseto infectado que transmite o fungo, pois plantas sem ataque de *O. nubilalis* podiam conter *B. bassiana* como endofítico. BING e LEWIS (1993) referem-se também ao fato de que o fungo *B. bassiana* vem sendo usado há longo tempo no controle da broca européia do milho, *O. nubilalis*, e que esse fungo, como já mencionado, é isolado como

endofítico do interior de plantas de milho. Isto poderia explicar a supressão da praga em certas estações do ano, correlacionada com a presença de *B. bassiana* na fase de senescência do milho (LEWIS e BING, 1991).

Recentemente WAGNER e LEWIS (2000) descreveram o modo de penetração do fungo entomopatogênico *B. bassiana* no milho utilizando métodos de microscopia de luz e eletrônica. Estes autores verificaram que depois da inoculação por aspersão foliar de conídios, as hifas em germinação cresceram ao acaso na superfície da folha, e quando houve a penetração das hifas os sítios de penetração eram localizados aleatoriamente, indicando que *B. bassiana* não requer sinais topográficos específicos e um local de entrada apropriado tal como alguns fungos fitopatogênicos. Poucas hifas foram observadas nos elementos do xilema e como os feixes vasculares estão interconectados ao longo da planta do milho, isto poderia explicar a migração de *B. bassiana* na planta fornecendo total proteção inseticida. WAGNER e LEWIS (2000) relataram, neste mesmo trabalho, que os bioensaios de virulência demonstraram que *B. bassiana* não perde a virulência para a broca européia do milho, *O. nubilalis* desde que o milho esteja colonizado por ela. Também fungos entomopatogênicos como *B. bassiana* e *Cladosporium* têm sido isolados de outros vegetais, como casca da planta *Carpinus caroliniana* (BILLS e POLISHOOK, 1991).

Vale a pena ressaltar que muitos fungos são conhecidos como produtores de metabólitos secundários, ativos sobre diversos organismos vivos, provocando inibição de crescimento, doenças e posteriormente sua morte. Dentre esses metabólitos, destacamos as aflatoxinas produzidas por linhagens de *Aspergillus flavus* (DIENER e DAVIS, 1969), ochratoxina de *Aspergillus ochraceus* (KODAIRA, 1961; MYOKEY et al., 1969). Vários fungos entomopatogênicos, dentre eles o *Metarhizium anisopliae*, também são conhecidos como produtores de metabólitos com ação sobre insetos, produzindo um ciclodipepsipeptídeo denominado complexo destruxina, já tendo sido identificados 23 tipos de destruxinas ativas sobre insetos (KODAIRA, 1962; 1969; CRISAN, 1971; KAIJIANG e ROBERTS, 1986; CIANCIO, 1996).

Os fungos *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus*, os do gênero *Fusarium* e o fitopatógeno *Polyporus sulphureus* também produzem os

ciclodipepsipeptídeos beauvericina, bassianolide e o complexo eniatina (WEST e BUGGS, 1968; GROVE e POPLE, 1980, LOGRIECO et al., 1996). A beauvericina provavelmente age como um ionóforo capaz de formar complexos com cátions divalentes (DORSCHER e LARDY, 1969; OVCHNNIKOV, 1974), podendo ser tóxica para alguns grupos de células (VEY et al., 1985). Alguns estudos mostram a capacidade inseticida deste metabólito, em especial sobre larvas de moscas e mosquitos (GROVE e POPLE, 1980) sendo que ele possui atividade tóxica sobre o besouro da batata do Colorado, tendo um  $CL_{50}$  de 663 ppm e  $CL_{90}$  de 1196 ppm (GUPTA et al., 1991).

O número de compostos químicos produzidos por fungos entomopatogênicos é maior que o previamente esperado. A função da maioria desses compostos é ainda desconhecida. Apesar de se conhecer a atividade antimicrobiana e inseticida de metabólitos produzidos pelo fungo *N. rileyi*, sua estrutura química e seu modo de ação são desconhecidos.

Essas substâncias, mesmo desconhecidas, devem ser consideradas como instrumentos potencialmente muito importantes para o melhoramento de fungos entomopatogênicos na agricultura, visando ao controle integrado de pragas. Alguns podem ser utilizados como inseticidas, outros como antibióticos, outros ainda para aplicação em campo no controle de insetos. A forma mais importante de utilização de metabólitos ativos contra insetos produzidos por fungos entomopatogênicos está na identificação dos genes envolvidos na produção desses metabólitos e associados à mortalidade dos insetos e posteriormente manipulados para produzirem organismos mais virulentos, inserindo genes em linhagens pouco ativas. Outra área bastante promissora é a inserção de genes em plantas para produzir compostos ativos, produzindo, assim, plantas menos susceptíveis ao ataque de insetos.

Espécies de fungos como *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, entre outras, são bastante usadas no controle biológico de insetos-praga da agricultura. Exemplos podem ser encontrados nos livros de LECUONA (1996), ALVES (1998) e MELO e AZEVEDO (1998). Se esses fungos existirem no interior das plantas como endofíticos, evidentemente eles poderão também atuar no controle de insetos. Mesmo

a sua ausência pode ser contornada, se for possível sua inoculação artificial em plantas e sua manutenção nelas. Também fungos endofíticos, apesar de não colonizarem insetos causando doenças, podem atuar não apenas como controladores naturais de pragas, como foi citado anteriormente, mas em um verdadeiro controle biológico, se forem artificialmente inoculados em plantas e exercerem um controle efetivo de pragas.

### 2.1.3.3 Manipulação genética e biotecnologia em microrganismos endofíticos

Existe uma série de razões para que se aprofundem os estudos com os fungos endofíticos. Primeiro, porque sua fisiologia é pouco conhecida e faltam informações para elucidar a base biológica da interação endofítico-hospedeiro. Segundo, porque os endofíticos são potencialmente vantajosos em diversos aspectos.

Mesmo fungos entomopatogênicos bastante conhecidos e já largamente empregados no controle biológico de insetos pragas da agricultura são encontrados como endófitos. Esse é o caso de *Beauveria bassiana*, encontrado como endófito no milho protegendo o hospedeiro contra o ataque de insetos (BING e LEWIS, 1993; WAGNER e LEWIS, 2000). Muitos outros casos são relatados, como pode ser apreciado na revisão de BREEN (1994).

Em certas gramíneas, a presença de fungos endofíticos reduz o ataque de insetos, como *Spodoptera frugiperda* e *S. eridiana* (BREEN, 1993a, 1993b). Nesse caso, é interessante o fato de *S. frugiperda* discriminar plantas infectadas por endófitos do gênero *Acremonium*. Não sendo atacadas por insetos, essas plantas tornam-se mais vigorosas e, conseqüentemente, resistem mais ao ataque de doenças e são selecionadas. Essa é uma maneira de seleção de determinados endófitos dentro de plantas (CLAY, MARKS e CHEPLICK, 1993). Também em algumas plantas de clima temperado, como os olmeiros, coleópteros transmitem certas doenças, como a causada pelo fungo *Ceratocystis ulmi*. Na presença do fungo endofítico *Phomopsis oblonga* as árvores são menos afetadas pela doença graças à proteção que o fungo proporciona, por diminuição do ataque dos insetos (BREEN, 1993a, 1993b). Muitos outros

exemplos são relatados em trabalhos de LASOTA, WALDVOGEL e SHETLAR, 1983; WHITE JR. e COLE, 1986; TAPER, ZIMMERMAN e CASE, 1986; TAPER e CASE, 1987; CLAY, 1988 e 1989; CLARK, MILLER e WHITNEY, 1989 e WILSON et al., 1995.

Associação com endofíticos pode oferecer um enorme potencial para biocontrole, já que o fungo está integrado ao sistema do hospedeiro (CLAY, 1989). Por essa mesma razão são ideais para serem usados para introdução de genes exógenos nos tecidos da planta. Endófitos hospedeiro- específico podem ser geneticamente manipulados para produzir substâncias em seus hospedeiros; um tipo de engenharia genética indireta de plantas para produção de “bioinseticida endofítico” geneticamente engenheirado e importante economicamente.

A presença ou ausência de microrganismos endofíticos em vegetais é de extrema importância para a proteção dos hospedeiros contra ataque de insetos e no controle de moléstias vegetais causadas por bactérias, fungos e nematóides. Com relação aos insetos, algumas aplicações por inoculação de microrganismos endofíticos tais como sua introdução em sementes ou em plantas; a aplicação de microrganismos entomopatogênicos que poderão atuar protegendo a planta disseminando-se entre as pragas e ocasionando sua redução em número. Através da infestação de uma planta por insetos, especialmente afídeos, é possível monitorar a presença de toxinas no interior dessas plantas, o que é importante quando se consideram gramíneas forrageiras (EISENCHER e DAHLMAN, 1992). Finalmente, programas de melhoramento têm sido conduzidos e neles procura-se associar variedades de plantas melhoradas com presença de microrganismos endofíticos que atuem eficientemente no controle de pragas, mas que não prejudiquem o gado que vai se alimentar dessas plantas (SAHA et al., 1987). Todos esses aspectos aplicados foram e estão sendo ainda timidamente abordados por grupos de pesquisa e, quando feitos, o são por grupos que trabalham com plantas de países de clima temperado. Evidentemente, resultados mais promissores devem ser esperados, quando aplicados em plantas de clima tropical que apresentam uma diversidade e incidência de pragas muito maior. Mais recentemente, a tecnologia do DNA recombinante está sendo empregada para uma manipulação

genética de microrganismos endofíticos visando à introdução de novas características genéticas de interesse agrônomico e inclusive visando ao controle biológico de pragas agrícolas.

FAHEY em 1988 descreveu os primeiros passos na construção e utilização da bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* para a obtenção de um produto comercial que foi chamado de “Incide”(composto pelos termos “in” = dentro e “cide”= matar). Essa bactéria recebeu um gene de outra bactéria, o *Bacillus thuringiensis*, produtor de toxinas ativas contra insetos, especialmente lepidópteros e coleópteros. Dessa maneira, a bactéria modificada geneticamente produz a toxina. Introduzida na planta hospedeira, atua protegendo a planta contra o ataque de insetos suscetíveis a essa toxina. O autor cita várias vantagens do processo de inoculação dessa bactéria em plantas de milho para torná-las resistentes aos insetos, tais como: a) para ser usado, o produto requer uma única aplicação em sementes ou aspersão em plantas jovens; b) o produto não requer inoculação de doses elevadas de bactérias, pois elas se multiplicam após a aplicação; c) a bactéria modificada geneticamente fica restrita e mantida na planta, não havendo portanto, disseminação do microrganismo engenheirado; d) o processo não produz resíduos tóxicos; e) este e outros produtos semelhantes requerem um tempo menor para seu desenvolvimento tecnológico, pois é mais fácil modificar um microrganismo do que uma planta; f) o microrganismo engenheirado não é transmitido via semente, de modo que fica contido na planta e, do ponto de vista de uma empresa de biotecnologia, ele tem que ser adquirido e inoculado em novas sementes usadas em plantios; g) o processo tem ampla aplicabilidade, pois pode ser usado para diferentes espécies de plantas; h) a multiplicação da bactéria no interior da planta é alta, pois foram detectadas até  $10^8$  bactérias por grama da planta inoculada.

Como se verifica, a quantidade de células bacterianas endofíticas dentro de um hospedeiro pode ser muito grande, o que inclusive pode dar resultados falso-positivos quando se faz transformação em plantas. É por exemplo o caso de TOR et al. (1992) que, estudando transformação em plantas do gênero *Discorea*, que compreende o cará ou inhame, pela introdução do gene GUS, verificaram que eram as bactérias endofíticas da planta que apresentavam a atividade GUS e não a planta hospedeira.

Embora em bactérias existam mais dados publicados, com relação aos fungos endofíticos, os trabalhos envolvendo a tecnologia do DNA recombinante restringem-se mais aos estudos de transformação genética, introdução de alguns genes e posterior inoculação dos fungos nos hospedeiros apropriados. Já no início dos anos 90, em revisão sobre fungos endofíticos do gênero *Acremonium*, VAN-HEESWIJCK e MC DONALD (1992) preconizavam o uso de linhagens de fungos endofíticos elite ou modificados por engenharia genética no controle de insetos e de moléstias que incidem sobre gramíneas como *L. perenne*. De fato, vários modelos foram desenvolvidos visando alterar geneticamente um fungo endofítico para depois reintroduzi-lo em plantas, favorecendo o controle de pragas. Estudos procurando obter transformantes com genes repórteres em fungos endofíticos foram feitos por MURRAY, LATCH e SCOTT (1992), que utilizaram uma linhagem de *Acremonium* designada de 187B, que não produzia a toxina lolitrem B e, portanto, era apropriada para ser reintroduzida em planta hospedeira. Esse fungo recebeu o gene beta-glucoronidase (*GUS*) e o número de transformantes foi de cerca de 700-800 por micrograma de DNA. O fungo transformado foi reintroduzido em *Lolium* e foi verificada a expressão do gene *GUS* no interior do hospedeiro, mostrando ser o processo apropriado para introdução de genes por meio de endófitos em plantas. Da mesma forma TSAI et al. (1992) padronizaram a técnica de transformação para *A. coenophialum*.

Vários genes de fungos endofíticos relacionados à produção de toxinas estão sendo clonados e estudados com maior profundidade. WANG et al. (1999) clonaram o gene da DMATsintase (dimetilail triptofano sintase), responsável pelo primeiro passo da síntese de ergot no fungo *Claviceps purpurea*. Conhecida a seqüência de nucleotídeos desse gene, foi verificado que nos fungos endofíticos *Balansia obtecta*, que produz ergobalansina, e *Neotyphodium* spp., que produz ergovalina, genes correspondentes ao clonado também ocorrem. Outro gene para a produção de peptídeo sintase também foi estudado, envolvendo o passo final da síntese de ergot. TUDZYNSKI et al. (1999) também clonaram o gene DMATS de *Claviceps purpurea*, responsável por um dos passos na produção do alcalóide ergot na planta. Outros genes do agregado gênico foram estudados; assim, vão sendo desvendados os genes

envolvidos e seu papel na produção de alcalóides do tipo ergot. YOUNG et al. (1999) também clonaram um agregado gênico contendo genes para a síntese de micotoxinas, como paxilina e lolitrem B de fungos endofíticos como *Epichloë*.

Estudos pioneiros referentes à manipulação genética em microrganismos endofíticos de plantas tropicais têm sido realizados por LONGO, 1995; PAMPHILE, 1997; BLANCO, 1999; PEREIRA, VIERA e AZEVEDO, 1999; GAI et al., 1999). Sua utilização no controle de pragas agrícolas pode ser uma alternativa para a redução do uso de compostos químicos na agricultura.

Vários autores referem-se aos endófitos como sendo capazes de produzir antibióticos quando cultivados *in vitro*, fato que os torna alvos na busca desses produtos ou de outros metabólitos secundários de interesse farmacológico (FISHER, ANSON e PETRINI, 1984; CALHOUN et al., 1992, STIERLE, STROBEL e STIERLE, 1993 e 1995; SIEBER e DORWORTH, 1994). Um bom exemplo é dado por STIERLE et al., 1995 e refere-se à produção de taxol, um agente anti-tumor de seio e ovário. Taxol é um derivado diterpenóide cuja extração é feita de *Taxus brevifolia*, de crescimento lento e apresentando baixo rendimento. Estes autores verificaram que o fungo endofítico *Taxomyces andrenae* isolado de floema de *Taxus brevifolia* produz taxol e outros componentes relacionados, quando cultivado em meio semi-sintético. Uma vez que este taxol tem atividade semelhante ao produzido pela planta, quanto à toxicidade de carcinomas, esta é uma fonte alternativa para produção desse fármaco.

LU et al. (1999) extraíram três novos metabólitos antimicrobianos de culturas de *Colletotrichum* sp., um endófito isolado de uma erva medicinal tradicional da China *Artemisia annua*, entre eles alguns derivados do ergosterol que possuem atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral.

MURRAY, LATCH e SCOTT (1992) transformaram o fungo endofítico *Acremonium* isolado de *Lolium perenne*, e após reintrodução verificaram a expressão do gene de interesse. Especialmente em gramíneas, todos os genes que o endofítico carrega passam para as próximas gerações da planta via invasão das hifas nos tecidos das sementes em desenvolvimento. Isto torna os endofíticos vetores genéticos em

potencial para introdução de genes de interesse, por exemplo, resistência a pragas, em plantas hospedeiras.

A produção de certos compostos como os antibióticos (FISHER, ANSON e PETRINI, 1986) e outros metabólitos, por microrganismos endofíticos, já sugeria que eles podem controlar doenças de plantas. De fato *Acremonium coenophialum*, um endófito comumente encontrado em gramíneas, tem efeitos inibitórios sobre vários patógenos (WHITE JR. e COLE, 1985; CLARK, MILLER e WHITNEY, 1989 e CALHOUN et al., 1992), podendo ser utilizado como micoherbicida no controle de ervas daninhas (CERKAUSKAS, 1988, CLAY, 1989 e DORWORTH et al., 1996).

Considerando os benefícios futuros, é cada vez mais importante o estudo de microrganismos endofíticos principalmente devido ao desequilíbrio biológico que vem sendo causado pelo uso abusivo e indiscriminado de agroquímicos que contribuem para modificar radicalmente a microbiota endofítica com resultados imprevisíveis podendo inclusive explicar a emergência de doenças e pragas até então desconhecidas ou sem importância econômica, em vegetais superiores. CLAY (1987), comparando cultivares comerciais com espécies naturais, verificou que estas possuem maior taxa de infecção de endofíticos, sugerindo que ocorra perda de endofíticos durante o processo de colheita e estocagem da semente, devido à maior sensibilidade do fungo ao período de estocagem do que a semente. Segundo o autor, plantas livres de endofíticos tem se tornado comuns pelo desenvolvimento da agricultura moderna.

Desta forma, o emprego cada vez maior de técnicas de tecidos na multiplicação e propagação de plantas de interesse agrônomo pode levar a uma "limpeza" de microrganismos endofíticos o que acarreta consequências imprevisíveis na produtividade e resistência a condições adversas nesses vegetais.

## 2.2 Hospedeiros utilizados e o controle biológico

### 2.2.1 Milho (*Zea mays* L.)

O comércio mundial movimentou mais de 65 milhões de toneladas de milho, na temporada 1998/99. A ocorrência da segunda maior safra norte-americana do milho da história, aliada a um aumento recorde de 19,2% na produção chinesa, ajudou a elevar

os estoques finais mundiais para 104,7 milhões de toneladas (AGRIANUAL, 2000).

O milho é nativo da América, foi introduzido na Europa e disseminado pelo mundo, sofrendo intenso processo de seleção e melhoramento. No Brasil, a cultura está passando por fase de acentuada evolução no rendimento de grãos, associada ao plantio direto e à necessidade de rotação de culturas, por causa de problemas com pragas e doenças que ameaçam a viabilidade da soja. A demanda por milho de melhor qualidade e por rendimentos elevados para viabilizar a produção econômica exige adoção de tecnologias avançadas. Nesse contexto o conhecimento sobre a fauna associada à cultura do milho torna-se necessária, para evitar danos das pragas (GASSEN, 1996).

Mais de uma centena de espécies de insetos e de outros animais pode desenvolver-se e atingir o nível de praga em milho. A identificação e o conhecimento de seus ciclos biológicos, seus hábitos alimentares e dos fatores de controle natural constitui-se na base das estratégias de manejo econômico e ecológico da fauna.

As pragas encontradas em lavouras de milho podem ser agrupadas em dependentes e em independentes da cultura. As espécies dependentes são especializadas e desenvolvem-se após a emergência das plantas. Elas dependem ou selecionam o milho para realizar a postura e desenvolver suas populações. A ocorrência e a intensidade de danos das pragas dependentes do milho são difíceis de serem previstas, pois estão sujeitas à habilidade de deslocamento, à capacidade de reprodução e ao tamanho da população existente no ecossistema em que se encontra a lavoura. Entre as pragas dependentes da cultura do milho destacam-se a larva-alfinete, a lagarta-do-cartucho, a lagarta-da-espiga, a mosca-da-espiga e os pulgões.

As pragas independentes da cultura desenvolvem-se nas plantas cultivadas ou daninhas que precedem o milho. Algumas vezes, o milho não é o hospedeiro principal mas, por causa da população presente na lavoura no momento da semeadura, podem ocorrer danos severos nas plântulas. Em geral, são pragas esporádicas, cuja ocorrência e intensidade de danos podem ser previstas, pois estão presentes antes da instalação da lavoura do milho. Nesse grupo, destacam-se as formigas, a larva-aramé, os cupins, os corós, a broca-do-azevém, a lagarta-elasmó, o ligeirinho, a lagarta-da-aveia, a lagarta-

rosca, os grilos, os percevejos e as cigarrinhas (GASSEN, 1996).

As pragas associadas ao milho também podem ser agrupadas de acordo com a ocorrência e danos, na fase de germinação, de plântula e de desenvolvimento vegetativo das plantas. As pragas causadoras de danos na fase de germinação (até a emergência das plantas), em geral, são independentes da cultura. Encontram-se em plantas daninhas ou na cultura dessecada ou rolada, antes da semeadura. Elas reduzem a população e a uniformidade de distribuição de plantas de milho. Nas lavouras planejadas para a alta produção é essencial manter entre quatro e seis plantas de milho/m<sup>2</sup>. Nessa fase, as pragas mais freqüentes são a larva-angorá, a mosca-da-semente, a larva-aramé, os cupins, os corós, o gorgulho-do-solo e os ratos.

Na fase de plântula, até quatro folhas, os danos de pragas podem ser causados por populações já existentes na lavoura. Essas pragas desenvolvem-se em plantas daninhas e nas culturas anteriores, caracterizando-se como independentes da cultura do milho. Nessa fase, predominam as pragas de superfície de solo, destacando-se a lagarta-da-aveia, a lagarta-rosca, a lagarta-nabo, a lagarta-elasma, as formigas, os corós, os percevejos, as cigarrinhas, a broca-do-azevém, as lesmas, os piolhos-de-cobra e os grilos.

Na fase de desenvolvimento vegetativo, a partir de quatro folhas até a maturação, predominam as pragas não dependentes da cultura. Em geral, os adultos são bons voadores e pouco afetados pelo manejo do solo e por outras práticas culturais. Nessa fase, ocorre a larva-alfinete, a lagarta-do-cartucho, a lagarta-da-folha, a lagarta-da-espiga e os pulgões (GASSEN, 1996).

No Brasil, a *Spodoptera frugiperda* (Smith), conhecida como lagarta-do-cartucho, é uma praga-chave da cultura do milho (*Zea mays* L.) e de outras culturas anuais (CRUZ, 1995 a), pode ocorrer durante todos os estádios de crescimento da cultura, assumindo grande importância no México, na América Central e na América do Sul. As perdas ocasionadas pela praga à cultura do milho são, geralmente indiretas, e variam com o estágio de desenvolvimento e do tipo de milho (CARVALHO, 1970; CRUZ, 1980; CRUZ e TURPIN, 1982, 1983; CRUZ et al., 1996, 1999a). Estima-se que os danos provocados por essa praga ocasionam prejuízos acima de 400 milhões de

dólares anuais à produção brasileira do milho (CRUZ, 1999).

O controle de *S. frugiperda* na cultura do milho é baseado em produtos químicos, empregados quando aparecem os primeiros sintomas de danos na cultura. Entretanto, devido aos problemas acarretados pelo uso constante desses produtos, especialmente em relação ao desenvolvimento de resistência e à redução da ocorrência de inimigos naturais (CRUZ et al., 1997, 1999), ênfase tem sido dada a medidas de controle mais ecológicas (CRUZ, 1995 a,b). Entre os agentes de controle biológico, os inseticidas à base de vírus, que são, na maioria, do grupo *Baculovirus* têm sido apontados como os de maior potencial para o desenvolvimento como bioinseticidas, devido à especificidade, a alta virulência ao hospedeiro e à maior segurança proporcionada aos vertebrados (TANADA e REINER, 1962; IGNOFFO, CHAPMAN e MARTIN, 1965; ALLEN, GREGORY e BRAZZEL, 1966; WHITLOCK, 1977; KLEIN e PODOLER, 1978; BURGESS, CROZIER e HEBER, 1980; MOSCARDI, 1986).

A ocorrência de fungos entomopatogênicos, em condições naturais, tem sido, aqui e em outros países, um fator importante na redução das populações de pragas. A grande variabilidade genética desses entomopatógenos pode ser considerada como uma das suas principais vantagens no controle microbiano de insetos. Com técnicas apropriadas de bioensaios é possível selecionar isolados de fungos altamente virulentos, específicos ou não, com características adequadas para serem utilizados como inseticidas microbianos, visando o controle de grande número de pragas das culturas econômicas.

Esses entomopatógenos vêm sendo estudados, no Brasil, há mais de sessenta anos. Todavia, foi somente depois de 1964, com a ocorrência de *Metharizium anisopliae* sobre as cigarrinhas da cana-de-açúcar, que os fungos receberam mais atenção dos pesquisadores. Dentre os principais fungos entomopatogênicos podemos citar *Metarhizium* Sorokin, *Beauveria* Vuillemin, *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viègas, *Hirsutella thompsonii* Fischer, *Aspergillus* Michelli, *Paecilomyces* Bainier, *Fusarium* Link (Atractium), *Sporoporella uvella* (Krass.) Gd., *Tolyposcladium* Gams, *Sporothrix* Hektoen e Perkins entre outros

(ALVES, 1998).

O gênero *Aspergillus* Michelli é geralmente encontrado sobre insetos na fase assexual, sendo ascomiceto na forma perfeita (sexual). Comumente é relatado como um agente secundário no processo-doença, sendo sua ocorrência comum sobre insetos moribundos, já colonizados por outros patógenos ou submetidos a diferentes tipos de estresse em condições de laboratório e campo. A contaminação via oral é a mais comum e o inseto pode morrer antes da pupação, porém GARCIA e HABIB (1978) inocularam *Aspergillus parasiticus* em lagartas de *Spodoptera frugiperda* por via oral e obtiveram mortalidade de adultos.

Fungos entomopatogênicos *Paecilomyces fumosoroseus* e *Nomuraea rileyi*, indígenas do estado de Colima e Michoacan, México, foram testados como agentes potenciais de controle biológico em *Spodoptera frugiperda* por LEZAMA et al. (1993). A taxa de mortalidade e a dose letal 50% (TL<sub>50</sub>) foram estimadas usando uma concentração de esporos de 100 milhões/mL. *Nomuraea rileyi* (strain 3) causou 100% de mortalidade no 1º, 2º, 3º e 4º instar e 97,5 e 77,5 % de mortalidade no 5º e 6º instar respectivamente. A TL<sub>50</sub> variou entre 4,4 e 9,8 dias. *Paecilomyces fumosoroseus* (strain 1) causou 98,8; 72,5; 22,5; 3,8; 5,0 e 0 % de mortalidade no 1º ao 6º instar respectivamente, com TL<sub>50</sub> de 2,4 a 4,9 dias. Assim, *Nomuraea rileyi* foi mais efetivo como agente potencial de controle biológico do que *Paecilomyces fumosoroseus* contra *Spodoptera frugiperda*.

BULTMAN e GANEY (1995), estudaram a hipótese de que fungos endofíticos vivendo em algumas plantas (gramíneas) parecem aumentar a resistência das plantas hospedeiras a insetos herbívoros. Algumas plantas da gramínea *Lolium perenne* infectadas e não infectadas artificialmente com o fungo endofítico *Acremonium lolii* e danificadas por ferimentos 4 semanas após germinação foram estudadas. Larvas de *Spodoptera frugiperda* foram alimentadas com material fresco das plantas danificadas e não danificadas por fungos endofíticos em um fator-2 (estado de infecção e dano). A interação entre os principais efeitos de dano e estado de infecção teve efeito significativo na massa pupal. Pupas criadas em plantas infectadas e danificadas apresentaram menor peso do que aquelas criadas em plantas infectadas e não

danificadas. O inverso foi verdadeiro para plantas não infectadas. Estes resultados sugerem que os endofíticos podem determinar uma resposta induzida por estes hospedeiros.

### 2.2.2 Soja (*Glycine max* (L.) Merrill)

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma planta pertencente à família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae* e nativa da Ásia. Atualmente é cultivada em várias partes do mundo e se constitui em uma importante fonte de proteína e óleo vegetal. A cultura da soja, que ocupa o segundo lugar no país, considerando-se área cultivada e produtividade, é de extrema importância econômica para o Estado do Paraná que é um dos maiores produtores, e para o Brasil, não somente em termos de divisas (exportação), mas para alimentação humana e animal (ROBBS e BITTENCOURT, 1998).

A região Sul, na última safra, destacou-se como maior produtora nacional, ocupando uma área de 6.228.726ha, com uma produção de 14.403.434ton, e rendimento médio de 2.312Kg/ha (dados IBGE-DIP Q/RS SDDI, safra 1998, citado por BARROS, ROSSATO e ONOFRE, 2000)

A monocultura da soja, implantada como alternativa de exploração agrícola desfavorece o equilíbrio do ambiente e favorece a explosão populacional de pragas, cuja ação é responsável pela perda de aproximadamente 30% da sua produtividade.

A cultura da soja está sujeita ao ataque de insetos, praticamente, durante todo o seu ciclo. Logo após a emergência, insetos como a lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*), o percevejo castanho (*Scaptocoris castanea* e *Atarsocoris brachiariae*), os corós e a broca-do-colo (*Elasmopalpus lignosellus*) podem atacar as plântulas. Posteriormente, a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*), a lagarta falsa-mêdeira [*Chrysodeixis (Pseudoplusia) includens*] e a broca-das-axilas (*Epinotia aporema*) atacam as plantas durante a floração. Com o início da fase reprodutiva, surgem os percevejos (*Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii* e *Euchistus heros*), que causam danos desde a formação das vagens até o final do desenvolvimento das sementes. Além destas, a soja pode ser atacada por outras espécies de insetos, em geral menos importantes do que estas. Os

insetos têm suas populações controladas naturalmente, por predadores, parasitóides e doenças, controle este dependente, principalmente, das condições ambientais. Porém, quando atingem populações elevadas, capazes de causar perdas significativas no rendimento da cultura, essas espécies necessitam ser controladas (EMBRAPA SOJA-2000).

Como citado anteriormente, existem várias espécies de pragas que podem provocar danos à cultura da soja, e pela frequência e abrangência com que elas se manifestam podem ser consideradas em dois grupos principais: as pragas-chaves, que exigem controle freqüente, apresentando-se em todas as estações de cultivo, e aquelas pragas que ocorrem esporadicamente em regiões restritas. Dentro do primeiro grupo encontram-se a lagarta-da-soja e os percevejos, uma vez que estas pragas são responsáveis por aproximadamente 90% das aplicações de inseticidas, devido à sua frequência e abundância em praticamente todas as regiões onde se cultiva soja no Brasil (MOSCARDI, 1990).

A principal praga dessa cultura é a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner (TURNIPSEED e KOOGAN, 1976; DE GASPARI e GOMEZ, 1982), a qual, em ataques intensos, chega a ocasionar 100% de destruição foliar em períodos de clímax populacional, em janeiro e fevereiro, nas regiões Norte e Sul do país, respectivamente (HOFFMANN-CAMPO, NEWMAN e FOERSTER, 1979; SILVA, 1993).

O controle das populações de lagartas que provocam desfolha na soja pode ser exercido pelos inimigos naturais e pelo homem, mediante a utilização das técnicas convencionais como o controle químico de largo espectro ou mediante a utilização de inseticidas altamente seletivos, isto é, afetando somente o inseto-praga. Apesar de os danos causados por insetos na cultura da soja serem, em alguns casos, alarmantes, não se recomenda a aplicação preventiva de produtos químicos, pois além do grave problema de poluição ambiental, a aplicação desnecessária pode elevar, significativamente, o custo da lavoura.

Entre os agentes biológicos de ocorrência natural, com possibilidade de serem utilizados no controle da lagarta-da-soja, destaca-se o fungo *Nomuraea rileyi*, um

patógeno que ocorre em mais de 32 espécies de insetos das ordens Coleóptera, Lepidóptera e Orthoptera. Cerca de 90% dos hospedeiros desse fungo pertencem à ordem lepidóptera, tendo como espécies importantes para as condições do Brasil, *A. gemmatalis*, *Cirphis latiuscula*, *Diatraea saccharalis*, *Plusia* sp e *Tricoplusia ni* (IGNOFFO, 1981; ALVES, 1998). A ocorrência do fungo *Nomuraea rileyi* em muitos agroecossistemas, sua capacidade de indução de epizootias, bem como o grande número de pragas susceptíveis a ele, são fatores favoráveis para a formulação econômica de um biopesticida.

Um dos exemplos do controle natural por microrganismo contra lagartas da soja é a utilização do fungo *Nomuraea rileyi*, que quando em condições climáticas apropriadas, principalmente umidade, mostra um controle de até 95-100% das populações de lagartas da soja (HOFFMANN-CAMPO, NEWMAN e FOERSTER, 1979; SALVADORI e GÓMEZ, 1981; MOSCARDI, CORRÊA-FERREIRA e HOFFMANN OLIVEIRA, 1984). Em anos de baixa precipitação pluviométrica, como na safra 1991/92 na região central do Paraná, as populações da lagarta-da-soja aumentaram devido à ação pouco eficiente do fungo.

Além de *Nomuraea rileyi*, existem outros fungos que matam as lagartas desfolhadoras, como *Entomophthora* spp., *Paecilomyces* provavelmente da espécie *tenuipes*, *Erynia radicans* e *Beauveria bassiana* (MOSCARDI et al., 1984; SOSA-GÓMEZ e MOSCARDI, 1991).

Em campos de feijão em Honduras, GREGORY JR. (1987) relatou o aparecimento de *Nomuraea rileyi* em larvas mortas de *Anticarsia gemmatalis* mostrando ser este um fungo com potencial uso em controle biológico. DAIGLE, BOETHEL e FUXA (1990), estudando três localidades no estado de Louisiana, EUA, durante os verões de 1984 e 1985, com o objetivo de identificar parasitóides nativos e patógenos que atacam *Pseudoplusia includens* e *Anticarsia gemmatalis*, bem como o estudo da abundância sazonal e o efeito destes agentes de controle na população hospedeira, verificaram que os patógenos mais comuns de *Anticarsia gemmatalis* foram *Entomophthora* sp e *Nomuraea rileyi*, especialmente nestes anos. *Nomuraea rileyi* causou uma mortalidade de 10,9 e 14,7% durante os anos de 1984 e 1985

respectivamente.

IGNOFFO e BOUCIAS (1992) relataram a atividade no controle de *Anticarsia gemmatalis* de 28 isolados de *Nomuraea rileyi*, um isolado de *N. atypicola* e um de *N. anemonoides*. As larvas de *Anticarsia gemmatalis* não se mostraram suscetíveis a 15 dos 30 isolados, sugerindo que não há relação entre origem geográfica dos isolados e sua habilidade para infectar larvas de ambas as espécies.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 MATERIAL**

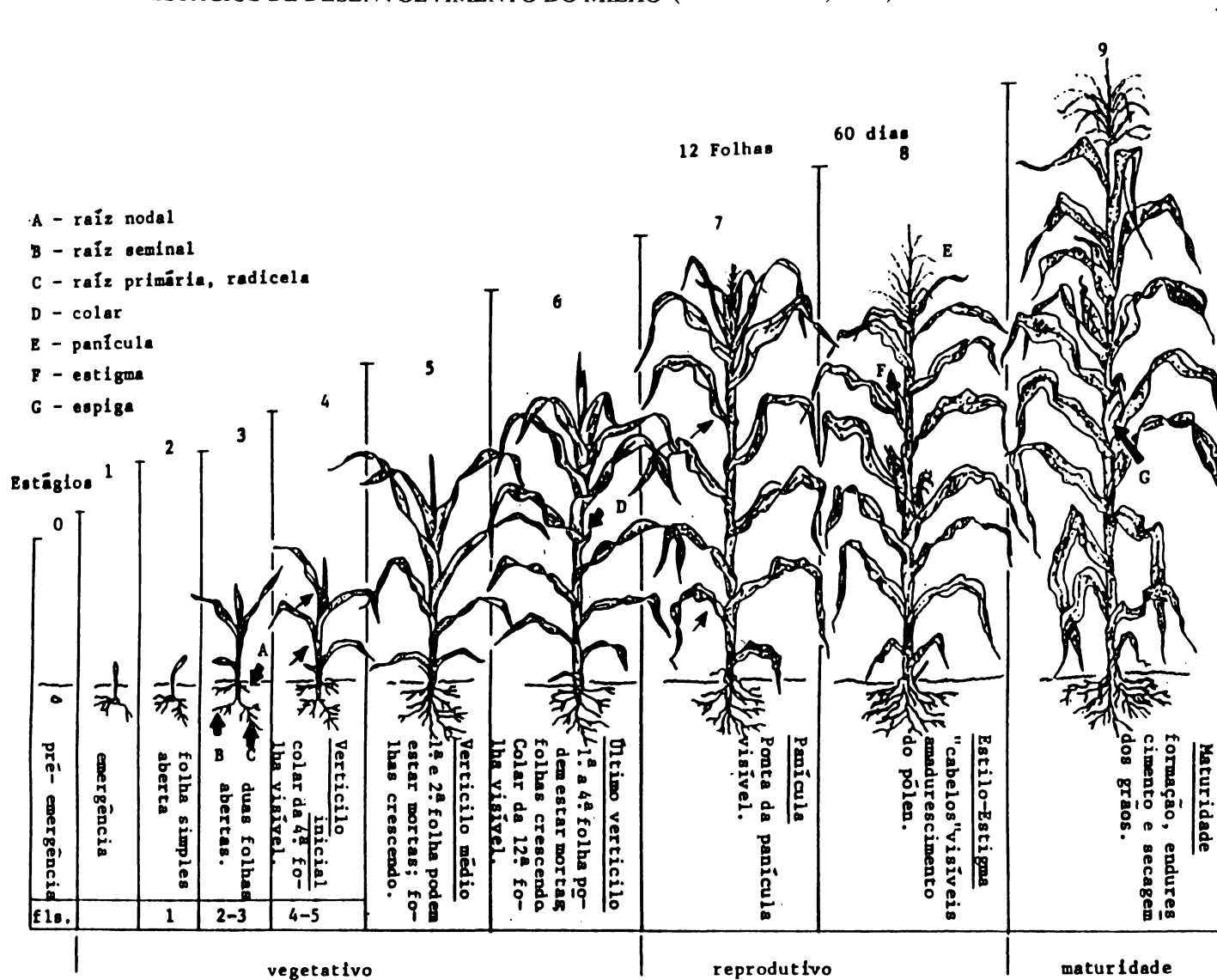
As amostras de campo de soja e milho foram coletadas no Centro de Estações Experimentais - Estação Experimental do Cangüiri do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

O experimento foi conduzido no período de novembro de 1998 a março de 1999, durante o mesmo período o experimento foi implantado em casa de vegetação do Departamento de Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

##### **3.1.1 Milho**

Foram utilizadas sementes de milho híbrido da cultivar OC 705 da COODETEC (Cooperativa Central Agropecuária de Desenvolvimento Tecnológico e Econômico Ltda - Cascavel/Paraná), sendo que estas sementes não receberam tratamento com agroquímicos. O solo utilizado no experimento no campo e em casa de vegetação foi o mesmo. As coletas no campo e em casa de vegetação foram de colmo e folhas das plantas em período de desenvolvimento (20 dias após a germinação das sementes) e no final do desenvolvimento reprodutivo na fase de polinização (aproximadamente 40 dias após a germinação das sementes) (FEHRET et al.,1971), conforme a Figura 1.

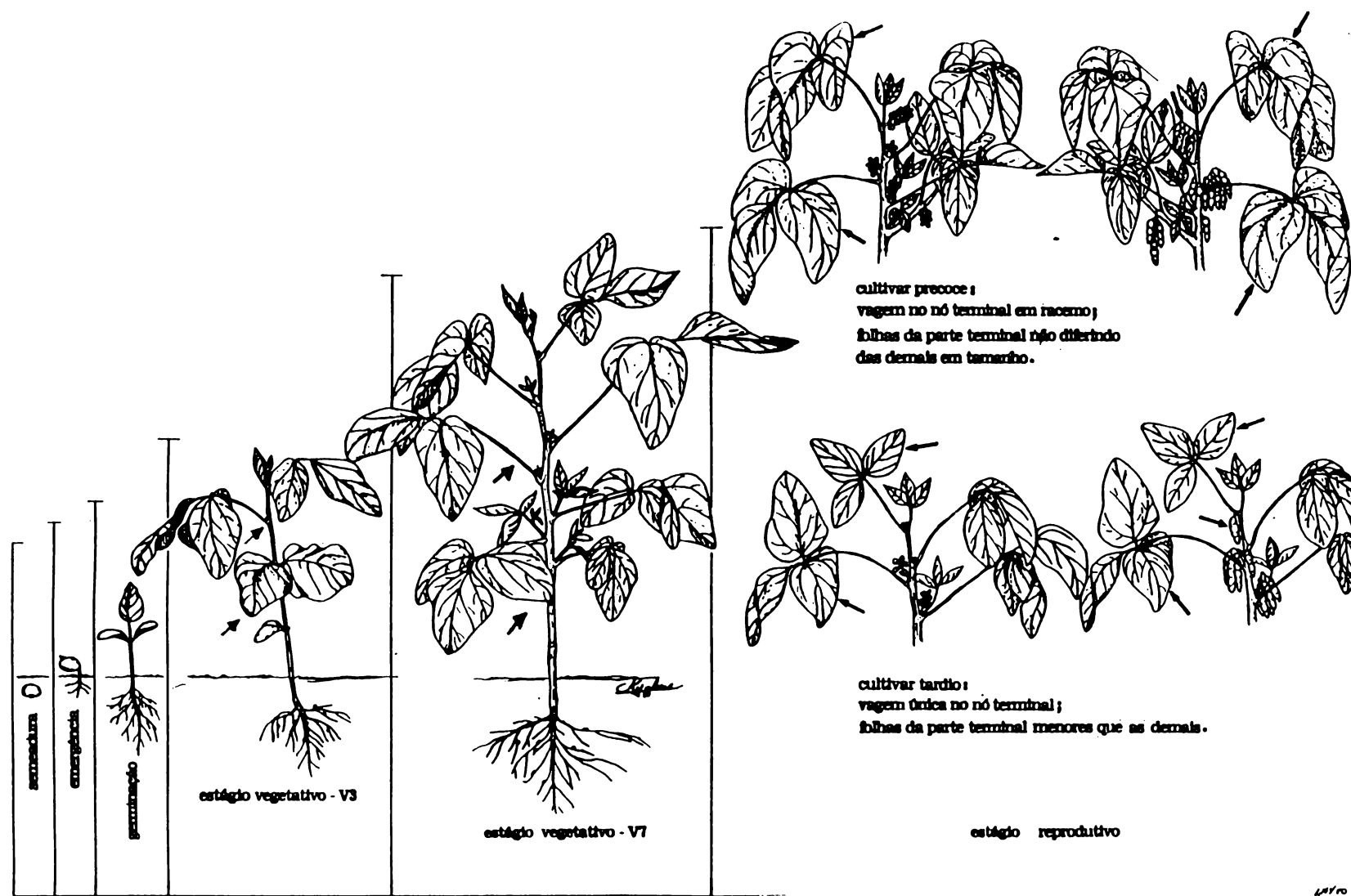
FIGURA 1 - ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO MILHO (FEHRET et al., 1971)



### 3.1.2 Soja

Foram utilizadas sementes de soja da variedade COODETEC 202 (Cooperativa Central Agropecuária de Desenvolvimento Tecnológico e Econômico Ltda - Cascavel/Paraná), sendo que a exemplo das de milho também não receberam tratamento com agroquímicos. As coletas de folhas e hastes das plantas no campo e na casa de vegetação foram feitas no estágio vegetativo V3 (três nós na haste principal começando com o nó interfoliar - aproximadamente 20 dias após a germinação das sementes) e no estágio reprodutivo R2 (flor no penúltimo nó da região do ápice com uma folha completamente desenrolada - aproximadamente 40 dias após a germinação das sementes (FEHRET et al., 1971), conforme a Figura 2.

FIGURA 2 – ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DA SOJA (FEHRET et al., 1971)



As plantas do campo foram coletadas de vários pontos da área plantada. Das plantas originadas do campo e da casa de vegetação, foram selecionadas folhas e colmos do milho e folhas e hastes de soja íntegros, sem qualquer tipo de pigmentação ou sintoma de doença. Foram coletadas 9 plantas (3 plantas para cada repetição) divididas em duas partes: A parte inferior da planta do milho e da soja considerada do solo até a inserção do 1º par de folhas e a parte superior das plantas do 1º par de folhas em diante. O material foi coletado nas plantas em diferentes idades, aproximadamente aos 20 dias e 40 dias após a germinação das sementes. As amostras foram processadas logo após a coleta.

### 3.3 MEIOS DE CULTURA

#### 3.3.1 Meio Ágar-Água (AA)

Ágar	15,0g
Água destilada	p/1000mL

Corrigiu-se o pH para 6,0 e 7,0 adicionando-se NaOH 1N e/ou HCl 1N conforme a necessidade.

#### 3.3.2 Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

Batata	200,0g
Dextrose	20,0g
Ágar	15,0g
Água destilada	p/1000mL

As batatas foram cortadas em pedaços pequenos e cozidas em 1 litro de água destilada por 1 hora. Após filtração, o caldo resultante foi completado para 1000 mL, e o pH foi corrigido para 6,8 com NaOH 1N e/ou HCl 1N conforme a necessidade.

### 3.3.3 Meio Ágar Farinha de Aveia (AFA)(CHASE, OSBORNE e FERGUSON, 1986)

Farinha de Aveia	60,0g
Ágar	15,0g
Água destilada	p/1000mL

A farinha de aveia foi fervida por aproximadamente 15 minutos. Após a filtração, o caldo resultante foi completado para 1000 mL, adicionado de 10 mg de cristal violeta, o pH foi corrigido para 6,8 com NaOH 1N e/ou HCl 1N. Foi adicionado 10,0 mL da solução de benomil após autoclavagem. Os meios foram suplementados com 100µg/mL de tetraciclina para impedir o crescimento bacteriano.

### 3.3.4 Meio MS ( MURASHIGE e SKOOG, 1962)

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 mg
KNO <sub>3</sub>	1900 mg
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	440 mg
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	370 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27,8 mg
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3 mg
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	22,3 mg
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,6 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg
KI	0,83 mg
NaMoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,25 mg
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,025 mg
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,025 mg
Mio-Inositol	100 mg
Ác. Nicotínico	0,5 mg

Piridoxina	0,5 mg
Tiamina	0,1 mg
Glicina	2,0 mg
Sacarose	30.000,0 mg
Água destilada esterilizada	1000mL

Acertou-se o pH para 5,8 com NaOH e HCl 0,1N. O meio foi distribuído em frascos (10 mL por frasco) e solidificado adicionando-se 1,5 g/L de Phytigel (Sigma).

Todos os meios foram autoclavados à 1 atm por 20 minutos

### 3.4 CORANTE E CLAREADOR

#### 3.4.1 Lactofenol azul de algodão (CRUZ, 1981)

Ácido láctico	20,0 g
Cristais de fenol	20,0 g
Glicerina	20,0 g
Azul de algodão (Methyl blue Difco)	0,05 g
Água destilada	20,0 mL

Os cristais de fenol foram fundidos em banho-maria, os compostos foram adicionados. Aguardou-se 24 horas e filtrou-se.

#### 3.4.2 Lactofenol de Amann (CRUZ, 1981)

Ácido láctico	10,0 g
Ácido fênico	10,0 g
Glicerina	20,0 g
Água destilada	10,0 mL

### 3.5 SOLUÇÕES

#### 3.5.1 Benomil

Benlate	100,0mg
Água destilada esterilizada	100,0mL

Adicionou-se ao Benlate aproximadamente 2 a 3 gotas de acetona para dissolvê-lo e em seguida adicionou-se água destilada autoclavada. Ferveu-se a solução em banho-maria por 10 a 15 minutos.

#### 3.5.2 Solução fixadora para microscopia eletrônica de varredura (MVE)

Glutaraldeído 3%	1,5mL
Tampão Cacodilato 0,2M	1,5mL

As soluções foram mantidas a 4°C.

### 3.6 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Após a coleta, todo o material, tanto de soja como de milho, foi lavado em água corrente, sempre tomando-se o cuidado de não ferir as amostras. Antes do processo de desinfecção externa de folhas, hastes e colmos, cada extremidade foi vedada com parafina derretida; esta metodologia de vedação serviu para impedir a entrada de hipoclorito e etanol no interior das amostras.

A técnica utilizada para a obtenção de fungos endofíticos tanto de sementes como de folhas, colmos e hastes, foi a desinfecção de superfície que consistiu em imersão 2 vezes em água destilada esterilizada, 1 minuto em etanol 70%, 4 minutos em hipoclorito de sódio 3%, 30 segundos em etanol 70% e finalmente lavados 3 vezes em água destilada esterilizada por 1 minuto. A seguir colmos, hastes e folhas foram

cortados assepticamente em 6 pequenos fragmentos (5-7 mm) e transferidos para placas de Petri (100 mm) contendo os meios de Ágar-Água (item 3.3.1), Batata-Dextrose-Ágar (item 3.3.2) e Ágar Farinha de Aveia (item 3.3.3), totalizando 1728 fragmentos. Foram feitas, de cada repetição, placas controle contendo 0,1 mL da última água destilada esterilizada utilizada na lavagem, para verificação de possíveis fungos contaminantes (epifíticos), (PETRINI, 1986). As placas foram incubadas a 28°C e 37°C durante 30 dias e observadas diariamente para verificação do crescimento nos meios de cultura citados anteriormente. Logo que os fungos iniciaram seu crescimento nas placas, pequenos fragmentos de ágar contendo pontas de hifas de cada fungo foram transferidos para tubos contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) inclinado (item 3.3.2). Os tubos foram incubados a 28°C e após o crescimento foram mantidos a 4°C.

### 3.6.1 Isolamento de fungos endofíticos de sementes

As sementes de soja e milho foram lavadas em água destilada esterilizada, posteriormente imergiram-se as sementes em álcool 70% durante um minuto, hipoclorito de sódio 3% durante vinte e cinco minutos, álcool 70% durante trinta segundos e água destilada esterilizada durante cinco minutos. Após este procedimento as sementes foram transferidas para frascos (duas sementes por frasco) contendo meio MS/2 livre de hormônios (item 3.3.4). Os frascos contendo as sementes foram transferidos para câmara de incubação a 26°C com fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de  $24\mu\text{M}/\text{m}^2\text{s}$  (PAMPHILE, 1997). Logo que os fungos iniciaram seu crescimento nos frascos, as hifas de cada fungo foram transferidas para tubos contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) inclinado (item 3.3.2). Os tubos foram incubados a 28°C e após o crescimento foram mantidos a 4°C. O experimento foi realizado no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

### **3.7 FREQUÊNCIAS DE INFECÇÃO**

As frequências de infecção foram determinadas após o isolamento dos fungos do interior dos fragmentos das folhas e colmos do milho e hastes e folhas da soja descrito no item 3.6 (CARROLL e CARROLL, 1978). A frequência de colonização das folhas, colmos e hastes por fungos foi definida com o número total de fragmentos de folhas, colmos e hastes contendo um ou mais fungos, em relação ao número total de fragmentos analisados.

### **3.8 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS**

A identificação dos isolados foi realizada por meio da observação de suas estruturas de reprodução (sexual e assexual), utilizando o método de cultura em lâmina ou técnica do microcultivo de acordo com o item 3.8.1 (KERN e BLEVINS, 1999) e de acordo com literatura especializada (ELLIS, 1971, 1976; BARNETT e HUNTER 1972; ARX, 1974; PETRINI, 1986; KONEMAN e ROBERTS, 1987; LARONE, 1987; ROSSMAN, PALM e SPIELMAN, 1987; ALVES, 1998). As lâminas foram fixadas, coradas em lactofenol com 0,05% de azul de algodão e lactofenol de Amann e analisadas ao microscópio ótico. A identificação de alguns fungos entomopatogênicos foi realizada através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) segundo item 3.8.2.

#### **3.8.1 Método de cultura em lâmina ou técnica do microcultivo (KERN e BLEVINS, 1999)**

Utilizou-se placas de Petri esterilizadas contendo em seu interior duas lâminas cruzadas e pedaços de algodão. Cortou-se um cubo de um centímetro quadrado de meio de Ágar-Batata-Dextrose(BDA) e colocou-se sobre a lâmina no interior da placa, inoculou-se um pedaço da colônia retirada do tubo estoque em todos os lados do cubo, colocou-se uma lamínula sobre o cubo inoculado, o algodão foi umedecido com

auxílio de pipeta com água destilada esterilizada. Incubou-se a temperatura de 28°C. Periodicamente as lâminas foram examinadas em microscópio ótico e quando a maturação foi evidente, a lamínula foi retirada da lâmina e colocada sobre uma lâmina limpa com uma gota de Lactofenol azul de algodão ou Lactofenol de Amann e observada ao microscópio ótico. As margens das lâminulas foram contornadas com parafina para torná-las permanentes.

### 3.8.2 Técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (STOFELLA, 1994)

Pedaços de lamínulas provenientes do microcultivo foram fixadas em glutaraldeído 3% associado a solução de cacodilato de sódio 0,2M (1:1). O material permaneceu neste fixador no mínimo 48 horas e sob resfriamento (5-6°C). A partir daí, as lamínulas foram lavadas de forma sucessiva (3 vezes), e durante um minuto a cada vez, em solução de cacodilato 0,2M. O material em tratamento foi desidratado em séries crescentes de álcool etílico da MERCK (30, 50, 70, 90, 100 e 100%) durante dez minutos em cada concentração de álcool. A secagem ao ponto crítico foi realizada no aparelho BLAZERS CPD-010. As lamínulas foram fixadas com auxílio de fita adesiva em suportes próprios para MEV (stub) e, finalmente metalizadas com uma fina película de ouro (BLAZERS SCD-030).

As lamínulas foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura PHILIPS SEM-505. Os filmes utilizados foram KODAK VERICHROME PAN-120.

Foram utilizados, como recursos auxiliares, a observação e fotografia das estruturas de frutificação em nível ótico, com a finalidade de facilitar a localização e identificação das estruturas registradas no microscópio eletrônico de varredura.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A variável considerada foi o número de fungos endofíticos e esses dados foram obtidos tanto na soja como no milho em ensaios experimentais onde utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições (PIMENTEL GOMES, 1985). As análises de variância foram realizadas em duas etapas: Na primeira etapa foi feita uma análise quantitativa onde não se considerou a existência de diferentes gêneros, ou seja, foram simplesmente contados os fungos endofíticos; esses dados foram analisados segundo um esquema fatorial e transformados para  $\log(x+2)$  por terem sido avaliados através de contagem (Anexos 1 e 2). A segunda etapa da análise foi realizada após a identificação desses fungos, os quais foram classificados em diferentes gêneros. Sempre que foi encontrado um valor significativo em relação ao Teste F para gêneros, completou-se a análise com o teste de Tukey para comparação de médias. Os dados relativos à análise de variância, considerando os gêneros identificados, foram transformados para  $\log \sqrt{x+0,5}$  (Anexos 3 e 12). O efeito de um tratamento com um grau de liberdade igual a 95 foi desdobrado da seguinte forma: As variáveis de 1ª ordem foram a origem, a temperatura, os órgãos das plantas, as partes da planta, os meios de cultura e a idade das plantas. Foram consideradas as interações simples, ou seja, aquelas envolvendo dois desses fatores, sendo que, as demais interações envolvendo 3, 4 e 5 não foram consideradas e passaram a fazer parte do resíduo.

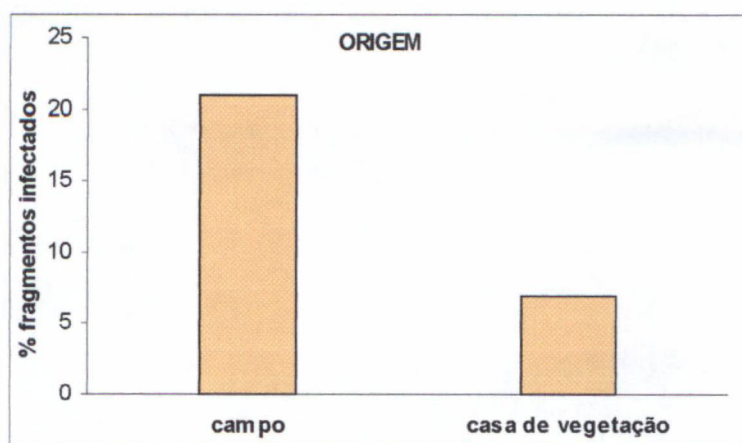
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise quantitativa dos fungos endofíticos do milho (*Zea mays* L.)

Em relação ao milho foram isolados 241 fungos endofíticos de 1728 fragmentos, dos quais, 71 colonizaram os colmos do milho em condições de campo e 43 em casa de vegetação; 110 colonizaram as folhas do milho no campo e 17 colonizaram as folhas em casa de vegetação.

A ANOVA mostrou que da análise individual dos seis fatores, três (origem, temperatura e meios de cultura) apresentaram diferenças significativas a 1% entre seus níveis, isto é, houve maior número de fungos isolados no campo (181) do que na casa de vegetação (60) (Figura 3), um maior número de fungos isolados quando o material foi cultivado a 28°C (165) do que a 37°C (76) e, finalmente, maior número de isolados quando utilizou-se os meios de cultura Ágar-Água (AA) (93) e Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (101) do que com o meio Ágar Farinha de Aveia (AFA) (47) (Tabela 1).

FIGURA 3 - PORCENTAGEM DE FRAGMENTOS INFECTADOS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS EM PLANTAS DE MILHO EM UMA AMOSTRA DE 864 FRAGMENTOS EM RELAÇÃO A DIFERENTES ORIGENS.



Com relação aos meios de cultivo empregados, os resultados obtidos neste trabalho diferem dos observados por PETRINI (1986), que encontrou vários meios adequados para o isolamento, embora com diferenças na recuperação de determinados endófitos. Estes resultados não surpreenderam, até porque o objetivo deste trabalho foi o isolamento de maior variabilidade de fungos endofíticos, especialmente de entomopatogênicos, motivo pelo qual três meios diferentes foram utilizados. Por outro lado BILLS e POLISHOOK (1991), em um trabalho de isolamento de fungos de *Carpinus caroliniana*, conseguiram diversos números de isolados ao empregarem diferentes meios para o isolamento. Um dos meios empregados pelos autores foi adequado para o isolamento de um número maior de endofíticos por planta, enquanto outros meios, contendo diferentes combinações de nutrientes, ou algum agente de inibição, permitiram o crescimento de alguns fungos raros.

Com este mesmo objetivo, utilizou-se duas temperaturas diferentes de incubação do material vegetal, e o fato de em 28°C ter sido isolado um número superior, não surpreende, pois de acordo com a literatura os endófitos são melhor isolados em temperatura entre 10°C e 28°C (FISHER, PETRINI e LAPPIN SCOTT, 1992).

TABELA 1- NÚMERO (N) E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO EM 144 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS E DISTRIBUÍDOS CONFORME AS ORIGENS, TEMPERATURAS E MEIOS DE CULTURA.

Meios	CAMPO						CASA DE VEGETAÇÃO							
	28°C		37°C		T0		28°C		37°C		T1		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
AA	53	36,80	20	13,89	73	25,35	13	9,03	7	4,86	20	6,94	93	16,14
BDA	48	33,33	28	19,44	76	52,78	10	6,94	15	10,42	25	8,68	101	17,53
AFA	29	20,14	3	2,08	32	11,11	12	8,33	3	2,08	15	5,21	47	8,16
Total	130	30,10	51	11,80	181	20,95	35	8,10	25	5,79	60	6,94	241	13,95

T0 = Total do campo

T1 = Total da casa de vegetação

AA - Ágar-água

BDA - Batata-Dextrose-Ágar

AFA - Ágar Farinha de Aveia

Como os endófitos em gramíneas são transmitidos via semente, se todos os endófitos aqui isolados fossem transmitidos via semente, então esperava-se números semelhantes em campo e casa de vegetação, porém, como em campo o isolamento foi superior ao da casa de vegetação, várias hipóteses podem ser levantadas: apenas uma parte dos endófitos encontrados no campo foi transmitida via semente e o restante possui outras fontes de infecção, como por exemplo, propagação aparentemente por meio de esporos que são dispersos principalmente pela chuva e correntes de ar; tal dispersão pode ocorrer também através de propágulos vegetativos de alguns hospedeiros. Estes endófitos chamados de mutualistas facultativos possuem uma associação muito menor com o hospedeiro quando comparados aos mutualistas constitutivos (transmitidos via semente), geralmente vivem em tecidos senescentes ou metabolicamente inativos, tais como o córtex ou epiderme, e colonizam tecidos vitais somente quando o hospedeiro é ferido ou estressado por ataques de insetos ou patógenos (CARROLL, 1988 e MCCUTHEON, CARROLL e SCHWAB, 1993). Em gramíneas os endófitos são transmitidos via semente e podem ser espalhados da planta hospedeira para indivíduos não infectados como ocorre com o endófito *Acremonium coenophialum* (MORGAN- JONES e GAMS; 1982; WHITE JR et al., 1991). Segundo WHITE JR e COLE (1985) e CARROLL (1988), em gramíneas como *Festuca* sp., os endófitos no caso de *Acremonium* sp. formam infecção sistêmica, sendo transmitidos de uma geração para outra por meio de sementes do hospedeiro, não necessitando esporular (CLAY, 1988). Assim sendo, em condições de campo existe uma probabilidade maior de infecção de fungos endofíticos por outras vias de disseminação (não via semente) do que em condições de casa de vegetação; isto, talvez explique os resultados aqui encontrados.

Outra hipótese seria que as condições climáticas podem ter interferido com a colonização dos tecidos. Trabalhos de RIESEN e CLOSE (1987) com fungos endofíticos em folha de cevada, indicaram que pode ocorrer o declínio da população de endófitos por mudança de condições climáticas, mudança na biologia ou nas condições ambientais das folhas ou ainda mudança na interação dos fungos na superfície das folhas. A reação de defesa da planta hospedeira ou a incapacidade de

absorção de nutrientes da planta sadia pode ser uma outra razão.

A deposição de esporos, germinação e/ou produção de estruturas de infecção são provavelmente dependentes de parâmetros ecológicos como velocidade do vento, luz, temperatura e alta umidade relativa os quais variam em diferentes altitudes do terreno, o que talvez possa explicar uma menor frequência destes fungos endofíticos em condições de casa de vegetação.

Para os outros três fatores analisados individualmente, ou seja, órgãos da planta (colmo ou folha); partes da planta (parte inferior ou parte superior) e idade da planta (20 dias ou 40 dias), não foi encontrada nenhuma diferença significativa (Anexo 1).

Porém, quando analisou-se dois fatores ao mesmo tempo, observou-se algumas interações simples (ou de 1ª ordem). Houve diferença significativa quanto aos fatores origem e temperatura, origem e órgãos da planta, origem e meios de cultura, origem e idade da planta e órgãos e idade da planta (Anexo 1).

De maneira geral, observou-se que a frequência de isolamento foi maior no campo do que na casa de vegetação. A Tabela 2 diz respeito ao número de fungos endofíticos encontrados, assim como o percentual em relação ao número de fragmentos utilizados, considerando-se as origens campo ou casa de vegetação e a temperatura, ou seja, se foi cultivado a 28°C ou a 37°C. No campo a 28°C foram encontrados 130 fungos e em contrapartida, nessa mesma temperatura em casa de vegetação, observou-se somente 35. Em relação a temperatura de 37°C os números correspondentes foram 51 fungos no campo e 25 em casa de vegetação, ou seja, embora um maior número de fungos tenha sido isolado do campo, a 28°C a magnitude dessa superioridade é muito maior. Isso caracteriza uma interação entre os dois fatores.

TABELA 2 – NÚMERO (N) E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO EM 432 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO. TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS DISTRIBUÍDOS CONFORME AS ORIGENS E TEMPERATURAS.

Temperatura	CAMPO		CASA DE VEGETAÇÃO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
28°C	130	30,09	35	8,10	165	19,10
37°C	51	11,81	25	5,79	76	8,80
Total	181	20,95	60	6,94	241	13,95

Cabe ressaltar que na casa de vegetação e no campo ocorreram diferenças ambientais significativas, ou seja, no campo a 28°C foi isolado um maior número de fungos do que em casa de vegetação nesta mesma temperatura; estes resultados podem ser explicados, talvez pelo fato de que as diferenças ambientais, como por exemplo locais úmidos e a contínua exposição ao inóculo podem interferir na taxa de infecção em algumas espécies hospedeiras como citado por CARROLL e CARROLL (1978).

De acordo com PETRINI et al. (1992) a ocorrência e distribuição de espécies de endofíticos não são dependentes somente do hospedeiro mas também do local.

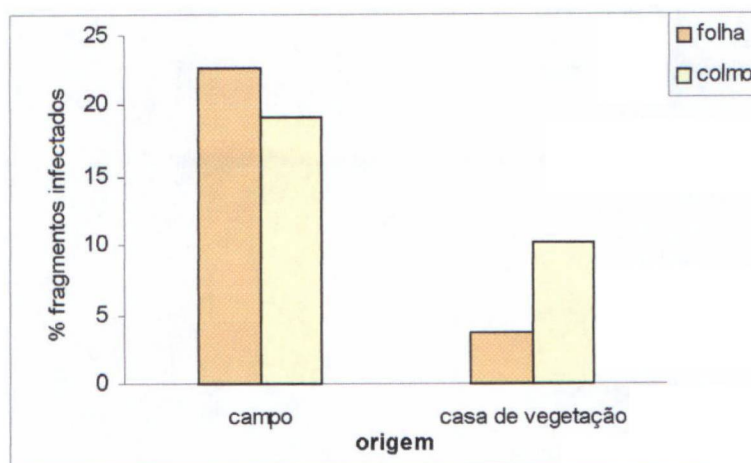
A Tabela 3 mostra também a existência de uma interação, entre a origem e o órgão da planta. O número de fungos isolados das folhas coletadas do campo foi de 98 enquanto que o número de fungos isolados das folhas oriundo da casa de vegetação foi de 16; para fungos isolados dos colmos coletados do campo o número foi de 83 e da casa de vegetação 44 (Figura 4). Observou-se um número de fungos muito maior no campo do que na casa de vegetação, em ambos os órgãos da planta porém, a magnitude da diferença quando comparou-se campo com casa de vegetação mostrou que a diferença é muito maior na folha do que no colmo.

Com relação à diminuição de fungos endofíticos na folha em casa de vegetação e um aumento no colmo podem ser explicados pelo fato de que no interior da casa de vegetação as condições ambientais não estavam adequadas, propiciando mudanças na biologia ou nas condições ambientais dos órgãos analisados ou ainda mudança na interação dos fungos na superfície da folha e do colmo.

TABELA 3 – NÚMERO (N) E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO EM 432 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO. TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS DISTRIBUÍDOS CONFORME AS ORIGENS E OS ÓRGÃOS DA PLANTA.

Órgãos	CAMPO		CASA DE VEGETAÇÃO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Folha	98	22,69	16	3,70	114	13,19
Colmo	83	19,21	44	10,19	127	14,70
Total	181	20,95	60	6,94	241	13,95

FIGURA 4 – PORCENTAGEM DE FRAGMENTOS INFECTADOS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO CONSIDERANDO AS ORIGENS E DIFERENTES ÓRGÃOS DA PLANTA.



A Tabela 4, mostra o isolamento de fungos endofíticos nos três meios de cultura utilizados, onde observou-se que nas condições de campo sempre foi isolado um número maior de fungos do que em casa de vegetação; porém, pode-se perceber que para cada condição um meio de cultura é melhor, então quando visa-se isolar um maior quantidade de fungos em casa de vegetação, o meio não tem grande importância, porém em condições de campo o AFA não apresentou-se muito adequado.

TABELA 4 – NÚMERO (N) E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO EM 288 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS DISTRIBUÍDOS CONFORME AS ORIGENS E OS MEIOS DE CULTURA

Meios	CAMPO		CASA DE VEGETAÇÃO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
AA	73	25,35	20	6,94	93	16,15
BDA	76	26,39	25	8,68	101	17,53
AFA	32	11,11	15	5,21	47	8,16
Total	181	20,95	60	6,94	241	13,95

AA – Ágar-água

BDA – Batata-Dextrose-Ágar

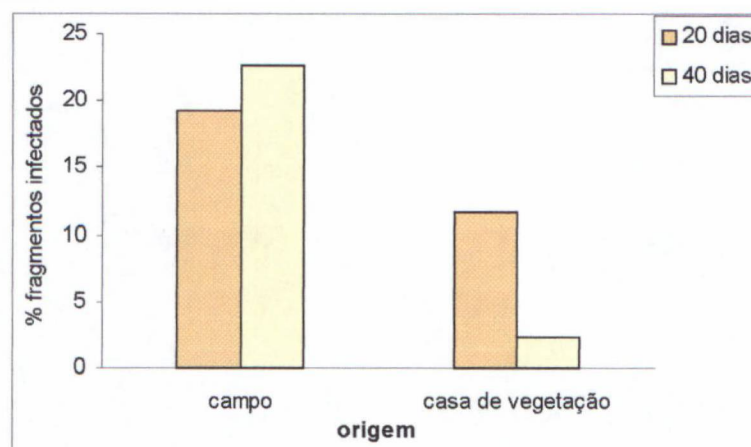
AFA – Ágar Farinha de Aveia

Quanto ao isolamento em diferentes idades das plantas, 20 dias e 40 dias após a germinação das sementes, encontrou-se resultados diferentes para campo e casa de vegetação. A Tabela 5 e Figura 5, mostram que o número de fungos isolados aos 20 dias foi respectivamente 83 e 50 para material oriundo do campo e da casa de vegetação e 98 e 10 quando a coleta aconteceu aos 40 dias

TABELA 5 – NÚMERO (N) E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO EM 432 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO. TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS DISTRIBUÍDOS CONFORME AS ORIGENS E A IDADE DAS PLANTAS.

Idade das plantas	CAMPO		CASA DE VEGETAÇÃO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
20 dias	83	19,21	50	11,57	133	15,39
40 dias	98	22,69	10	2,31	108	12,50
Total	181	20,95	60	6,94	241	13,95

FIGURA 5 - PORCENTAGEM DE FRAGMENTOS INFECTADOS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO. CONSIDERANDO AS ORIGENS E DIFERENTES IDADES DAS PLANTAS (20 DIAS E 40 DIAS)

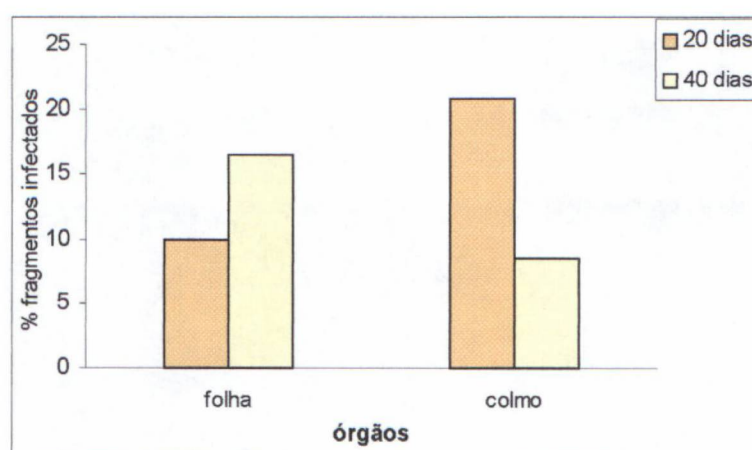


A Tabela 6 e a Figura 6, relacionam os órgãos da planta (folha e colmo) com a idade das plantas, 20 dias e 40 dias; o número de fungos isolados da folha aos 20 dias foi de 43 e no colmo foi de 90, aos 40 dias foram isolados 71 fungos da folha e 37 do colmo. Aqui a interação mostrou que para o isolamento de fungos da folha, a melhor idade da planta foi aos 40 dias, enquanto que para o colmo a melhor idade da planta foi aos 20 dias.

TABELA 6 – NÚMERO (N) E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO EM 432 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO, TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS DISTRIBUÍDOS CONFORME OS ÓRGÃOS E IDADES DAS PLANTAS.

Idade das plantas	FOLHA		COLMO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
20 dias	43	9,95	90	20,83	133	15,39
40 dias	71	16,44	37	8,56	108	12,50
Total	114	13,19	127	14,70	241	13,95

FIGURA 6 - PORCENTAGEM DE FRAGMENTOS INFECTADOS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE MATERIAL ORIGINADO DE PLANTAS DE MILHO. CONSIDERANDO OS ÓRGÃOS DAS PLANTAS (COLMO E FOLHA) EM DIFERENTES IDADES DAS PLANTAS (20 DIAS E 40 DIAS)



Uma das hipóteses levantadas para explicar uma diminuição no desenvolvimento dos fungos endofíticos nos colmos do milho aos 40 dias em casa de vegetação (Tabelas 5 e 6 e Figuras 5 e 6), talvez se deva ao fato da temperatura se encontrar extremamente elevada ou de condições de aeração e umidade inadequadas no interior da casa de vegetação, o que provavelmente pode ter levado à morte ou à não colonização dos tecidos por estes fungos, o mesmo não se repetindo em condições de campo.

Trabalhos com a caracterização de fungos endofíticos em folhas saudáveis de *Nicotiana spp* (SPURR e WELTY, 1975) em condições de campo mostraram que o número de endófitos aumentou significativamente com o desenvolvimento das folhas, que concordam com os resultados aqui encontrados como mostra a Tabela 5 e Figura 5. Em outro trabalho, realizado por BREEN (1992), observou-se que duas a três

semanas após a germinação das sementes as hifas do fungo penetraram intercelularmente no tecido da folha e do caule e que a concentração do micélio variou dentro da planta. Durante o crescimento vegetativo, o micélio de *Acremonium lolii* em azevém perene reside na bainha das folhas, e folhas velhas têm maior concentração de micélio do que folhas novas (BRENNER dados não publicados). PEREIRA, AZEVEDO e PETRINI (1993) relataram que a frequência de infecção das folhas aumenta com o aumento da idade das plantas, como foi encontrado nas folhas de milho aos 40 dias como mostra a Figura 6. PETRINI (1991) sugere que endófitos imigram para dentro dos tecidos da planta, como mostrado por KINDEL, ANDREWS e NORDHEIM (1989).

Em geral tem sido demonstrada uma correlação entre aumento na riqueza de espécies e/ou frequência de colonização e idade do tecido (PETRINI e CARROLL, 1981; ESPINOSA-GARCIA e LANGENHEIN, 1990). Normalmente, comunidades de diferentes endófitos caracterizam amostras de folhas de classes de diferentes idades, e a mudança na diversidade da associação de endófitos está correlacionada com a distribuição de algumas espécies diferentes em folhas jovens e folhas velhas (PETRINI, 1991).

CANAVESI (1987), LEGAUT, DESSUREAUT e LAFLAMME (1989 a, 1989 b) e CABRAL (1985) defendem a hipótese que certos fungos da filosfera colonizam o interior dos órgãos das plantas somente quando a frequência de espécies de endófitos verdadeiros diminui, depois do começo da senescência dos tecidos. Endófitos facultativos são provavelmente encontrados muito frequentemente em tecidos velhos.

FISHER et al. (1994) isolaram 23 gêneros de endófitos de quatro plantas de *Opuntia stricta* crescendo em quatro localidades da Austrália. A maioria dos gêneros eram espécies cosmopolitas relatadas de um grande número de hospedeiros, mas inúmeros fungos específicos de hospedeiros foram descobertos. A presença de dois anamorfos Xylariaceae, *Geniculosporium* sp. e *Nodulisporium* sp., entre isolados de *Opuntia* confirma a ampla distribuição destes fungos. A posição dos lóbulos na planta e a sua idade aparentemente determinam o grau de colonização em todos os locais.

FISHER et al. (1994) confirmaram que dentro de um dado limite geográfico, a

freqüência da colonização do endófito pode ser dependente da disponibilidade do inóculo e da posição do tecido da planta mais do que da localização geográfica das amostras.

Inúmeros fatores tais como idade da folhagem e planta, localização e umidade do local, e estação afetam a distribuição e diversidade das espécies de fungos endofíticos (PETRINI, 1991). RODRIGUES (1994) relatou que o total de endófitos isolados em folhas de *Euterpe oleracea* aumentou com a idade dos tecidos. Estes dados foram consistentes com estudos realizados por PETRINI (1991). Por outro lado a riqueza e a diversidade das espécies não estavam relacionadas com a idade da folha.

A ocorrência e distribuição de fungos endofíticos difere em árvores novas e adultas de *E. oleracea* (RODRIGUES, 1994). O número total de isolados de árvores jovens aumentou significativamente com o tempo e idade das folhas, apesar de não terem sido detectadas mudanças na riqueza das espécies. Por outro lado, algumas espécies de fungos não foram freqüentemente isoladas de árvores novas como árvores adultas ou vice-versa (RODRIGUES, 1994).

Cabe ressaltar que nas variáveis campo e casa de vegetação ocorreram diferenças ambientais significativas e como citado por CARROLL e CARROLL (1978) em algumas espécies hospedeiras a taxa de infecção aumenta em locais úmidos e diminui em locais secos e a contínua exposição ao inóculo pode ser um fator de aumento da taxa de infecção com a idade da folha.

Estes resultados permitem apontar que, para o material oriundo do campo e cultivado a 28°C, seja do colmo ou da folha ou da parte inferior ou superior da planta ou ainda, do material coletado aos 20 dias na casa de vegetação e aos 40 dias no campo, não existem diferenças para o isolamento de fungos endofíticos do milho.

#### 4.2. Análise quantitativa dos fungos endofíticos da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)

Neste trabalho pioneiro em soja no Brasil foram isolados 297 fungos endofíticos de 1728 fragmentos, dos quais 106 fungos colonizaram as hastes da soja no campo e 42 colonizaram as hastes em casa de vegetação, 118 fungos colonizaram as folhas no campo e 31 colonizaram as folhas em casa de vegetação.

Com relação à soja a ANOVA mostrou que, da análise individual dos seis fatores, quatro deles (origem, temperatura, meios de cultura e partes da planta) apresentaram diferenças significativas à 1% entre seus níveis (Anexo 2).

Assim, houve um maior número de fungos isolados do campo (231) do que da casa de vegetação (66) e um maior número de isolados quando o material foi cultivado a 28°C (243) do que a 37°C (54) (Tabela 7 e Figura 7). Em relação aos meios de cultura utilizados, foi isolado um maior número de fungos em BDA (114) e AA (106) do que em AFA (77). E, finalmente, em relação às partes das plantas observou-se um maior número de isolados das folhas coletadas na parte inferior da planta no campo (75) do que nas folhas coletadas na parte superior das plantas em casa de vegetação (15); em relação à haste da soja, houve um maior número de isolados das hastes coletadas na parte inferior das plantas no campo (69) e em casa de vegetação nas hastes coletadas na parte superior (21).

Outros fatores individuais, órgãos da planta (folha ou haste) e idade das plantas, (20 dias e 40 dias), quando analisados em sua totalidade não revelaram diferença significativa.

TABELA 7 – NÚMERO (N) E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA EM 144 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS E DISTRIBUÍDOS CONFORME AS ORIGENS, TEMPERATURAS E MEIOS DE CULTURA.

	CAMPO						CASA DE VEGETAÇÃO							
	28°C		37°C		T0		28°C		37°C		T1		Total	
Meios	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
AA	70	48,61	11	7,64	81	28,12	12	8,33	13	9,03	25	8,68	106	18,40
BDA	77	53,47	10	6,94	87	30,21	19	13,19	8	5,55	27	9,37	114	19,79
AFA	57	39,58	6	4,17	63	21,87	8	5,55	6	4,17	14	4,86	77	13,37
Total	204	47,22	27	6,25	231	26,74	39	9,03	27	6,25	66	7,75	297	17,18

T0 = Total do campo

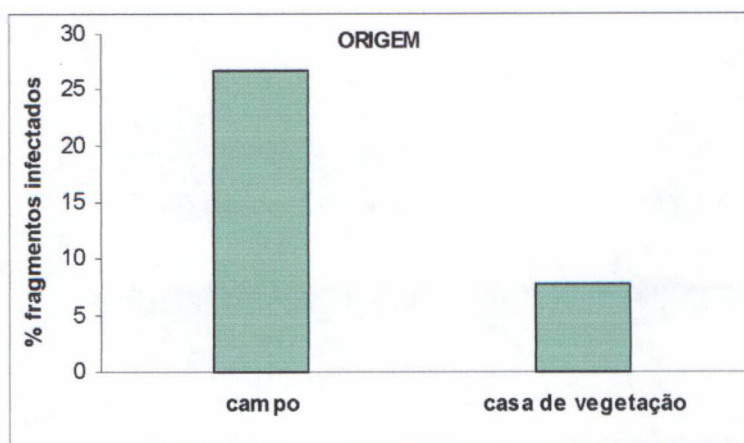
T1 = Total da casa de vegetação

AA – Ágar-água

BDA – Batata-Dextrose-Ágar

AFA – Ágar Farinha de Aveia

FIGURA 7 - PORCENTAGEM DE FRAGMENTOS INFECTADOS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS EM PLANTAS DE SOJA EM UMA AMOSTRA DE 864 FRAGMENTOS EM RELAÇÃO A DIFERENTES ORIGENS.



Também para a soja encontrou-se um maior número de isolados no campo. No milho a transmissão foi via semente e por outras fontes de infecção, na soja a transmissão via semente não ocorreu, pode-se levantar a hipótese de que a transmissão destes endófitos se deu por outras fontes de infecção como por exemplo, através de esporos que são dispersos principalmente pela chuva e correntes de ar e pela dispersão através de propágulos vegetativos de alguns hospedeiros. Estes endófitos chamados de mutualistas facultativos, geralmente vivem em tecidos senescentes ou metabolicamente inativos, tais como o córtex ou epiderme, e colonizam tecidos vitais somente quando o hospedeiro é ferido ou estressado por ataques de insetos ou patógenos (CARROLL, 1988 e MCCUTHEON, CARROLL e SCHWAB, 1993).

Um menor número de isolados em casa de vegetação talvez se deva ao fato da temperatura extremamente elevada, bem como condição de aeração e umidade inadequada no interior da mesma, o que provavelmente levou à morte ou à não colonização dos tecidos por estes fungos; já as condições climáticas no campo variaram grandemente, pois o cultivo dessas plantas ocorreu em meses de alta pluviosidade.

Isto foi comentado por SRIDHAR e RAVIJARA (1995) que observaram que as condições climáticas influenciam grandemente a germinação dos esporos fúngicos e a infecção final, e que o aumento das condições de umidade aumenta o nível de infecção dos endófitos.

Um outro fator que pode ter influenciado o aumento no número de endófitos no campo é que folhas e caules senescentes são excelentes materiais para o estabelecimento da conexão anamórfica-teleomórfica (PETRINI, 1986) e que a deposição de esporos, germinação e/ou produção de estruturas de infecção são provavelmente dependentes de parâmetros ecológicos como velocidade do vento, luz, temperatura e alta umidade relativa, os quais variam em diferentes altitudes do terreno; todas essas condições talvez possam explicar uma menor frequência destes fungos endofíticos em condições de casa de vegetação na cultura da soja.

Da mesma forma como foi feito com o milho, quando analisou-se dois fatores ao mesmo tempo, observou-se que houve algumas diferenças significativas em relação a algumas interações simples, como já ditas, aquelas de 1ª ordem, quanto a origem e temperatura, origem e partes da planta, origem e idade das plantas e finalmente temperatura e órgãos da planta (Anexo 2).

A Tabela 8 mostra o número de fungos endofíticos encontrados, assim como a porcentagem em relação ao número de fragmentos trabalhados, considerando as origens campo e casa de vegetação e a temperatura, ou seja, cultivo a 28°C ou a 37°C. Observou-se que no campo a 28°C foram isolados 204 fungos e em casa de vegetação apenas 39. Em relação à temperatura de 37°C tanto no campo quanto em casa de vegetação foi isolado o mesmo número de fungos ou seja, 27. No campo o número de fungos isolados foi bem maior do que em casa de vegetação e a condição ideal para o cultivo foi a 28°C. Novamente na soja, assim como já citado para o milho, as melhores condições para o isolamento de fungos endofíticos ocorrem em condições de campo e em cultivo a uma temperatura de 28°C, pois as diferenças que podem ocorrer na micoflora da soja se devem em parte a diferenças no ambiente (MILLER e ROY, 1982).

TABELA 8 – NÚMERO (N) E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA EM 432 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO, TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS DISTRIBUÍDOS CONFORME AS ORIGENS E TEMPERATURAS.

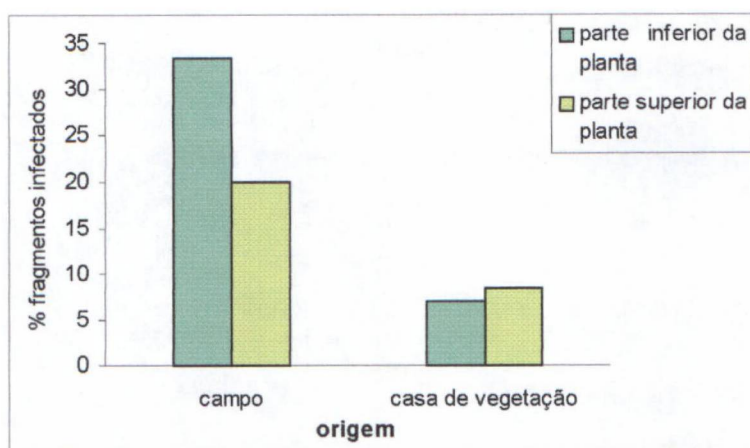
Temperatura	CAMPO		CASA DE VEGETAÇÃO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
28°C	204	47,22	39	9,03	243	28,12
37°C	27	10,88	27	6,25	54	6,25
Total	231	26,74	66	7,64	297	17,19

Na interação envolvendo as partes da planta com a origem, observou-se que na parte inferior das plantas no campo foram isolados 144 fungos, enquanto que na casa de vegetação foram isolados 30 fungos, na parte superior das plantas foram isolados 87 fungos no campo e 36 na casa de vegetação. Deve-se salientar que no campo isolou-se um número maior de fungos tanto na parte inferior das plantas quanto na superior, mas a diferença entre a parte inferior e superior em casa de vegetação foi pequena (Tabela 9 e Figura 8).

TABELA 9 - NÚMERO (N) E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA EM 432 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO, TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS DISTRIBUÍDOS CONFORME AS ORIGENS E REGIÕES DA PLANTA.

Partes da planta	CAMPO		CASA DE VEGETAÇÃO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Inferior	144	33,33	30	6,94	174	20,14
Superior	87	20,14	36	8,33	123	14,24
Total	231	26,74	66	7,64	297	17,19

**FIGURA 8 - PORCENTAGENS DE FRAGMENTOS INFECTADOS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS DE SOJA ORIGINADAS DO CAMPO E DE CASA DE VEGETAÇÃO, CONSIDERANDO AS DIFERENTES PARTES DA PLANTA (FOLHAS E HASTES COLETADAS DA PARTE INFERIOR E SUPERIOR DAS PLANTAS).**



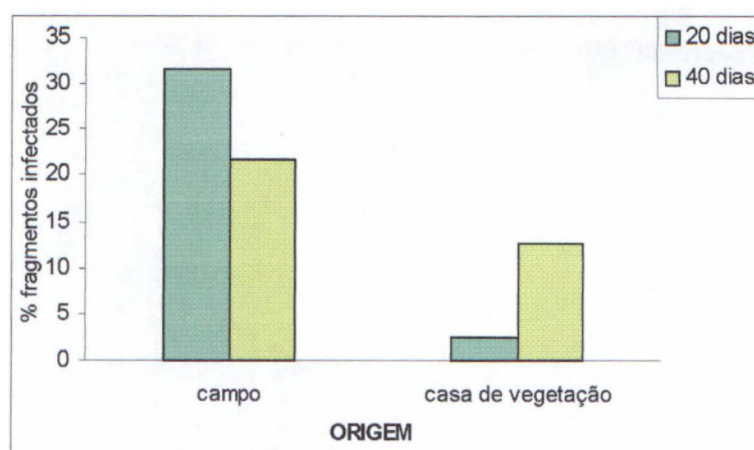
Os resultados aqui encontrados como mostra a Tabela 9 e a Figura 8 não surpreendem, já que segundo MILLER e ROY (1982), a incidência dos fungos está geralmente relacionada com o estágio de desenvolvimento do órgão da planta dos quais eles são isolados, sendo que a maioria dos fungos aumenta em frequência com a idade do órgão da planta, neste trabalho com o milho em condições de campo na parte inferior da planta houve uma maior frequência de colonização do que na parte superior da planta.

A Tabela 10 e Figura 9 foi elaborada com o propósito de se demonstrar a interação origem com a idade da planta. Nesta observou-se que aos 20 dias o número de fungos isolados no campo foi de 137 e na casa de vegetação 11, já aos 40 dias o número de fungos isolados no campo foi de 94 enquanto que na casa de vegetação foi de 55. Foi encontrado no campo aos 20 dias um maior número de isolados, enquanto na casa de vegetação um maior número foi encontrado aos 40 dias.

TABELA 10 – NÚMERO (N) E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA EM 432 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO, TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS DISTRIBUÍDOS CONFORME AS ORIGENS E IDADE DAS PLANTAS.

Idade da planta	CAMPO		CASA DE VEGETAÇÃO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
20 dias	137	31,71	11	2,55	148	17,13
40 dias	94	21,76	55	12,73	149	17,24
Total	231	26,74	66	7,64	297	17,19

FIGURA 9 – PORCENTAGENS DE FRAGMENTOS INFECTADOS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS DE SOJA, CONSIDERANDO AS DIFERENTES ORIGENS E DIFERENTES IDADES DAS PLANTAS (20 DIAS E 40 DIAS).



Um grande número de trabalhos descrevem situações relacionadas com a idade das plantas; segundo PETRINI (1991) vários fatores tais como idade da folhagem e planta, localização e umidade do local, e a estação afetam a distribuição e a diversidade das espécies de fungos endofíticos. RODRIGUES e SAMUELS (1994) relatou que o total de endófitos isolados em folhas de *Euterpe oleracea* aumentou com a idade dos tecidos. Estes dados foram consistentes com estudos realizados por PETRINI (1991). Por outro lado, a riqueza e a diversidade das espécies não mostraram relação de dependência com a idade da folha.

Trabalhos referentes à distribuição de endófitos realizados por BERTONI e CABRAL (1988) com *Eucalyptus vimminalis* indicam que a frequência aumenta com a idade da folha, e entre diferentes estágios de maturidade. O aumento de infecção com a idade da planta é comum em outras espécies de plantas (BERSTEIN e CARROLL,

1977; PETRINI e MÜLLER, 1979, PETRINI e CARROLL, 1981).

MILLER e ROY (1982) citam também que em folhas e vagens maduras senescentes de soja alguns fungos são mais freqüentemente isolados do que outros.

O aumento da população fúngica com idade do órgão da planta é relatado entre trabalhos de pesquisa em outras espécies (PETRINI e CARROLL, 1981). Estes autores relataram que o aumento dos fungos pode estar relacionado com a troca do estado nutricional dos órgãos da soja, com a idade, porque há freqüentemente um aumento no conteúdo de nutrientes na parte aérea das plantas, e nutrientes exógenos aumentam com a germinação dos esporos e crescimento de alguns fungos. Um aumento de nutrientes foi apontado como maior fator considerado para aumento da população fúngica com a idade dos tecidos também de outros hospedeiros (PETRINI e CARROLL, 1981).

Uma última interação significativa encontrada envolve a temperatura e os órgãos da planta. Observou-se um maior número de fungos isolados na folha a 28°C do que a 37°C, na haste o número de fungos isolados foi de 106 a 28°C e 39 a 37°C, ou seja, tanto para o isolamento de fungos da folha como da haste da soja, a melhor temperatura para o isolamento destes fungos foi a 28°C, mas se fixarmos a temperatura, a de 28°C é melhor para o isolamento de fungos da folha e a 37°C melhor para os fungos da haste da soja (Tabela 11).

Trabalhos realizados por MILLER e ROY (1982) onde relataram que o fato de as folhas serem mais colonizadas do que as vagens (do final do pedúnculo, do meio e do final de cada vagem), e estas mais do que as sementes é consistente devido à sua relativa exposição ao inóculo dos fungos, porque as folhas estão mais expostas e têm uma área de superfície de exposição maior do que vagens e as vagens protegem as sementes do inóculo. Tal aumento pode também estar relacionado a troca do estado nutricional da folha e a produção de água que aumentam a germinação e desenvolvimento dos propágulos.

Ainda MILLER e ROY (1982) estudando a micobiota de folhas, vagens e sementes de soja no Mississippi encontraram que a freqüência com a qual os fungos ocorrem em um dado órgão varia anualmente, e que a freqüência de *Glomerella*

*cingulata* e *Colletotrichum dematium* var. *truncata* em folhas exemplifica esta variação. Baseado na porcentagem do total dos isolados, as folhas foram colonizadas por fungos em uma maior extensão do que as vagens e estas mais do que as sementes.

TABELA 11 – NÚMERO (N) E PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA DE 432 FRAGMENTOS PARA CADA TRATAMENTO. TOTALIZANDO 1728 FRAGMENTOS DISTRIBUÍDOS CONFORME AS TEMPERATURAS E ÓRGÃOS DA PLANTA.

Órgãos	28°C		37°C		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Folha	137	31,71	15	3,47	152	17,59
Haste	106	24,54	39	9,03	145	16,78
Total	243	28,12	54	6,25	297	17,19

Assim, as melhores condições para o isolamento de fungos endofíticos da soja seria de material originado do campo, da folha ou da haste, cultivados a temperatura de 28°C. Com relação a diferenças quanto a origem e partes das plantas (Figura 8), observou-se no campo um maior número de fungos isolados na parte inferior da planta do que na parte superior; já com relação à idade das plantas de soja no campo aos 40 dias encontrou-se um menor número de fungos, talvez pelo fato de as condições ambientais não terem favorecido a infecção durante o período de crescimento da soja; já em casa de vegetação, aos 40 dias, na soja, isolou-se um maior número de fungos, e esta mesma situação não ocorreu com o milho. Uma das explicações poderia ser a competição entre fungos nesta idade da planta em condições de campo, ou ainda pode ter havido um aumento da incidência de fungos antagônicos, que muitas vezes podem ser encontrados em vagens, sementes e parte aérea de outras espécies de plantas (FOKKEMA, 1978). Em casa de vegetação para a soja houve uma menor interferência de fatores ambientais, como umidade e contato com a parte aérea de outras espécies, o que provavelmente pode ter facilitado o desenvolvimento destes fungos até a idade da planta de 40 dias.

Outros trabalhos indicam que a competição entre fungos, diferenças no estado nutricional dos órgãos das plantas e respostas dos fungos a diferentes temperaturas e umidade influenciam a colonização dos fungos em plantas de soja. Assim, folhas,

vagens e sementes de soja maduras e imaturas são colonizadas por diversos grupos de fungos (MILLER e ROY, 1982).

Um número de fatores tais como idade da folhagem e planta, localização e umidade do local e estação interferem com a distribuição e diversidade das espécies de fungos endofíticos (PETRINI, 1991).

#### 4.3. Gêneros de fungos isolados do milho e da soja.

Após a identificação dos fungos (item 3.8), estes foram separados em nove grupos isolados do milho e oito grupos isolados da soja. Os gêneros encontrados foram: *Alternaria* sp. (Figura 10), *Cladosporium* sp. (Figura 11), *Curvularia* sp. (Figura 12), *Chaetomium* sp. (Figura 13), *Scopulariopsis* sp. (Figura 14), *Drechslera* sp. (Figura 15) que são fungos dematiáceos, *Colletotrichum* sp. (Figura 16), *Fusarium* spp. (Figura 17), *Acremonium* sp. (Figura 18), *Aspergillus* sp. (Figura 19), *Penicillium* sp. (Figura 20), *Mycelia sterilia* (Figura 21), *Beauveria* sp. (Figura 22 e 23), *Paecilomyces* sp. (Figura 24 e 25). Na soja não foi encontrado o gênero *Beauveria* sp.

FIGURA 10 - A - COLÔNIA DE *Alternaria* sp., ISOLADO DA FOLHA DA PARTE INFERIOR DA PLANTA DO MILHO DO CAMPO AOS 40 DIAS A 37°C EM MEIO BDA. B - FOTOMICROGRAFIA DE MACROCONÍDIOS MULTICELULARES, DIVIDIDOS POR SEPTOS TRANSVERSAIS E LONGITUDINAIS DE *Alternaria* sp. (AUMENTO DE 400 X)

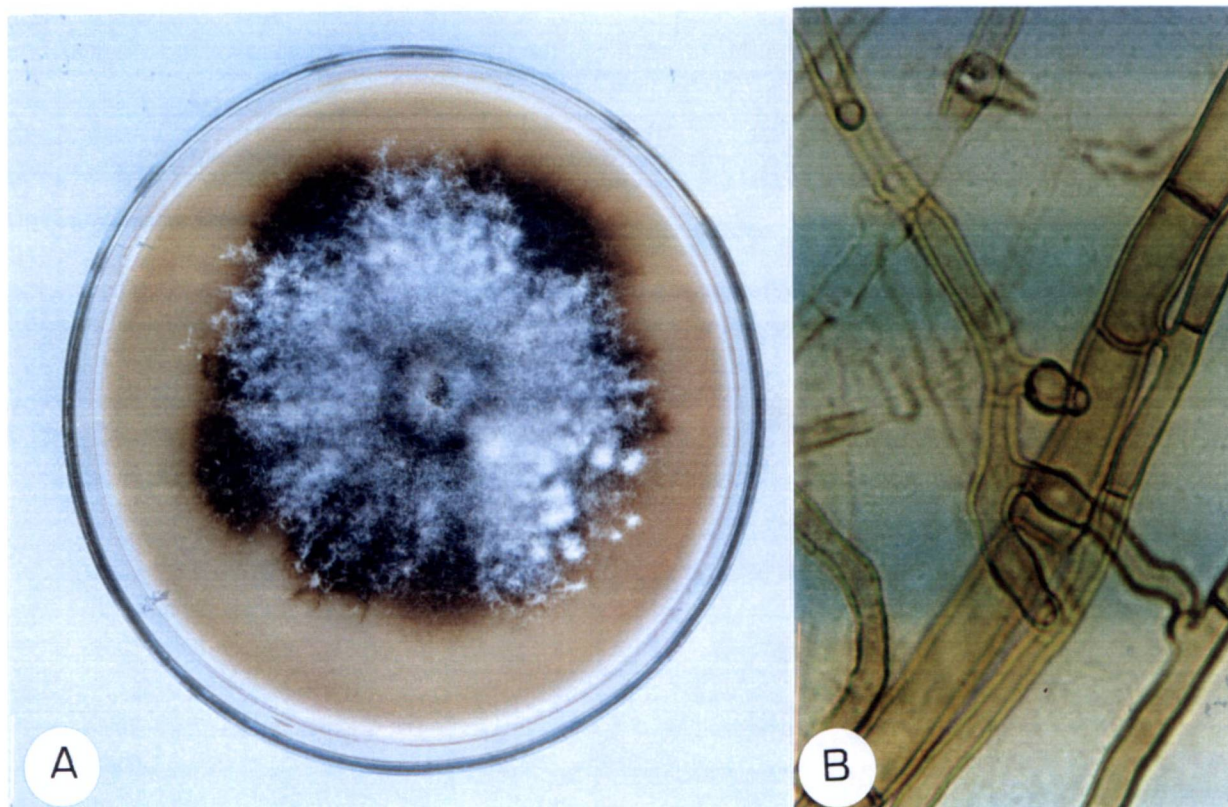


FIGURA 11 - A - COLÔNIA DE *Cladosporium* sp., ISOLADO DA FOLHA DA PARTE INFERIOR DA PLANTA DO MILHO DO CAMPO AOS 40 DIAS A 28°C EM MEIO BDA. B - FOTOMICROGRAFIA DE CONÍDIOS OVAIS DE *Cladosporium* sp. EM LARGAS CADEIAS A PARTIR DE CONIDIÓFOROS RAMIFICADOS (AUMENTO DE 400X)

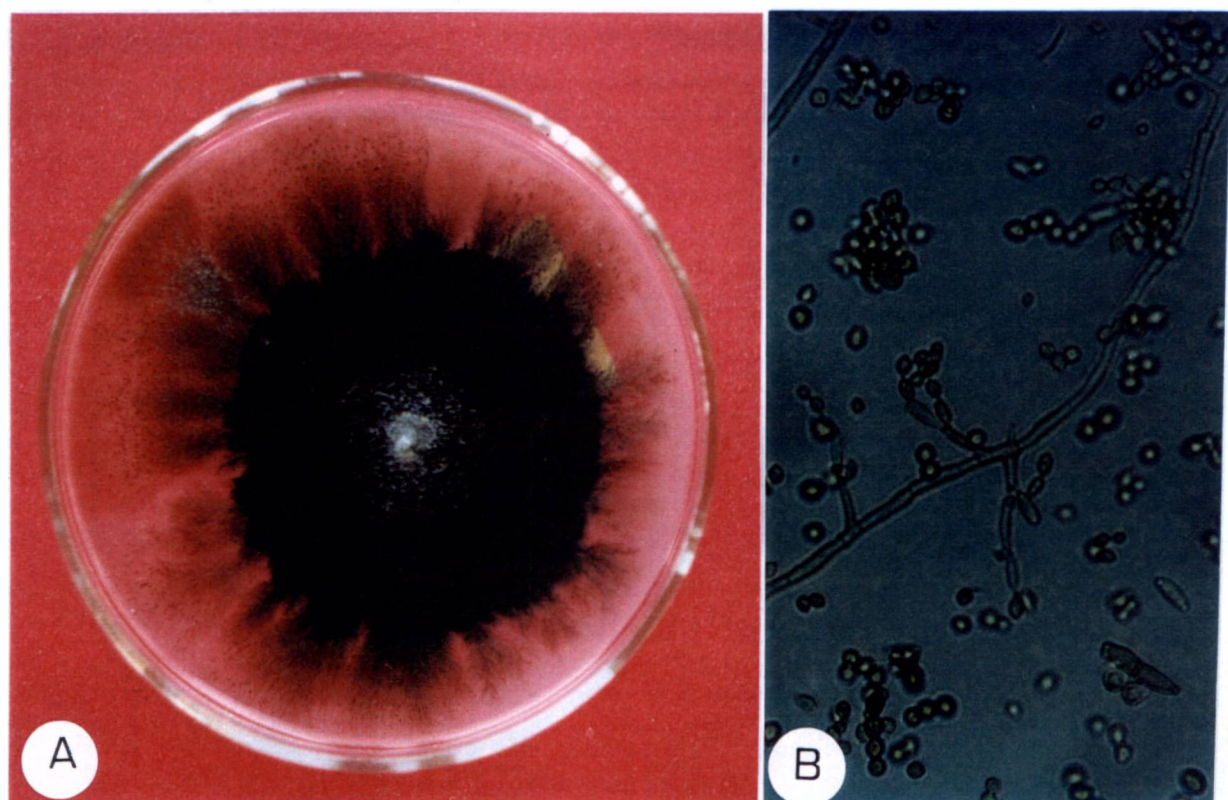


FIGURA 12 - A - COLÔNIA DE *Curvularia* sp., ISOLADO DA FOLHA DA PARTE INFERIOR DA PLANTA DO MILHO AOS 40 DIAS. A 37°C EM MEIO BDA. B - MACROCONÍDIOS MULTICELULARES DE *Curvularia* sp DIVIDIDOS POR TABIQUES TRANSVERSAIS COM CÉLULAS CENTRAIS QUE PRODUZEM UM ASPECTO CURVADO (AUMENTO DE 400X).

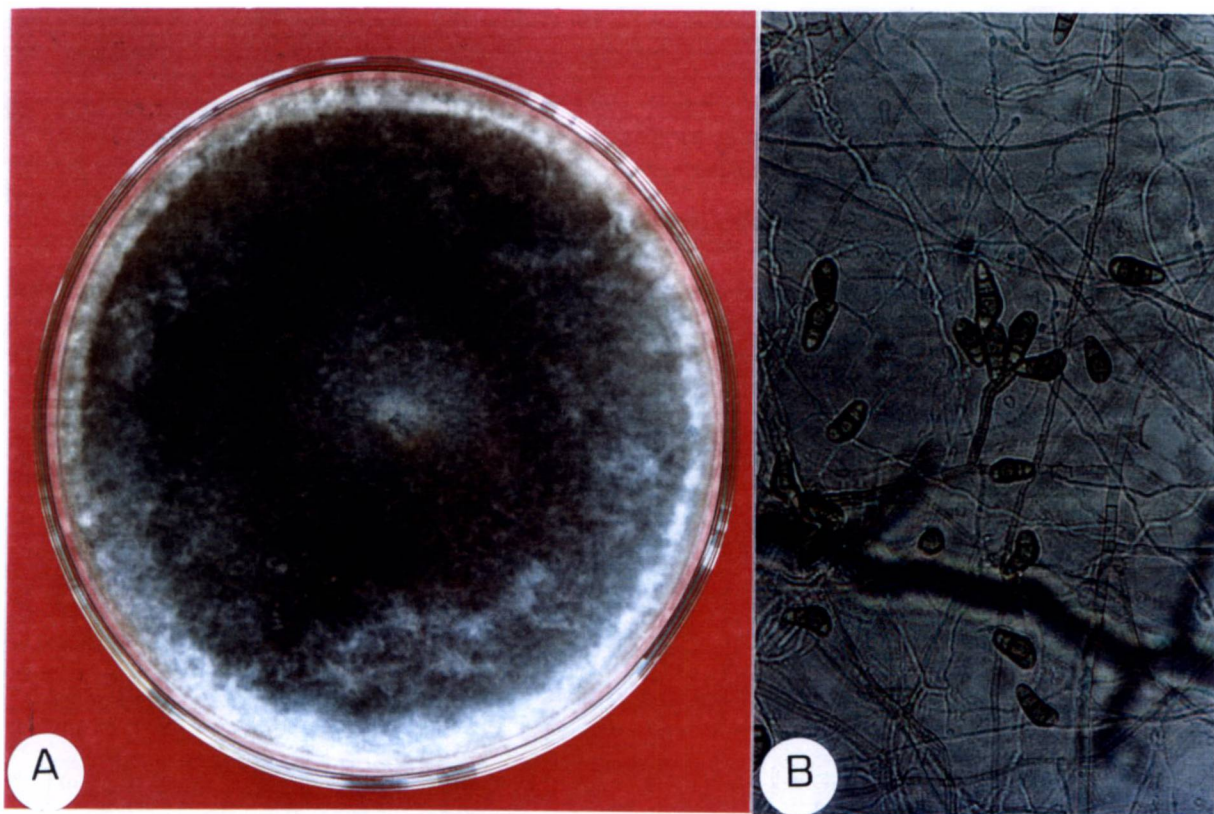


FIGURA 13 - A - COLÔNIA DE *Chaetomium* sp., ISOLADO DO COLMO DA PARTE SUPERIOR DA PLANTA DO MILHO DO CAMPO AOS 40 DIAS A 28°C EM MEIO AA. B - HIFAS SEPTADAS DE *Chaetomium* sp. COM PERITÉCIO OVAL COM APÊNDICES FILAMENTOSOS RETOS (AUMENTO DE 400X).

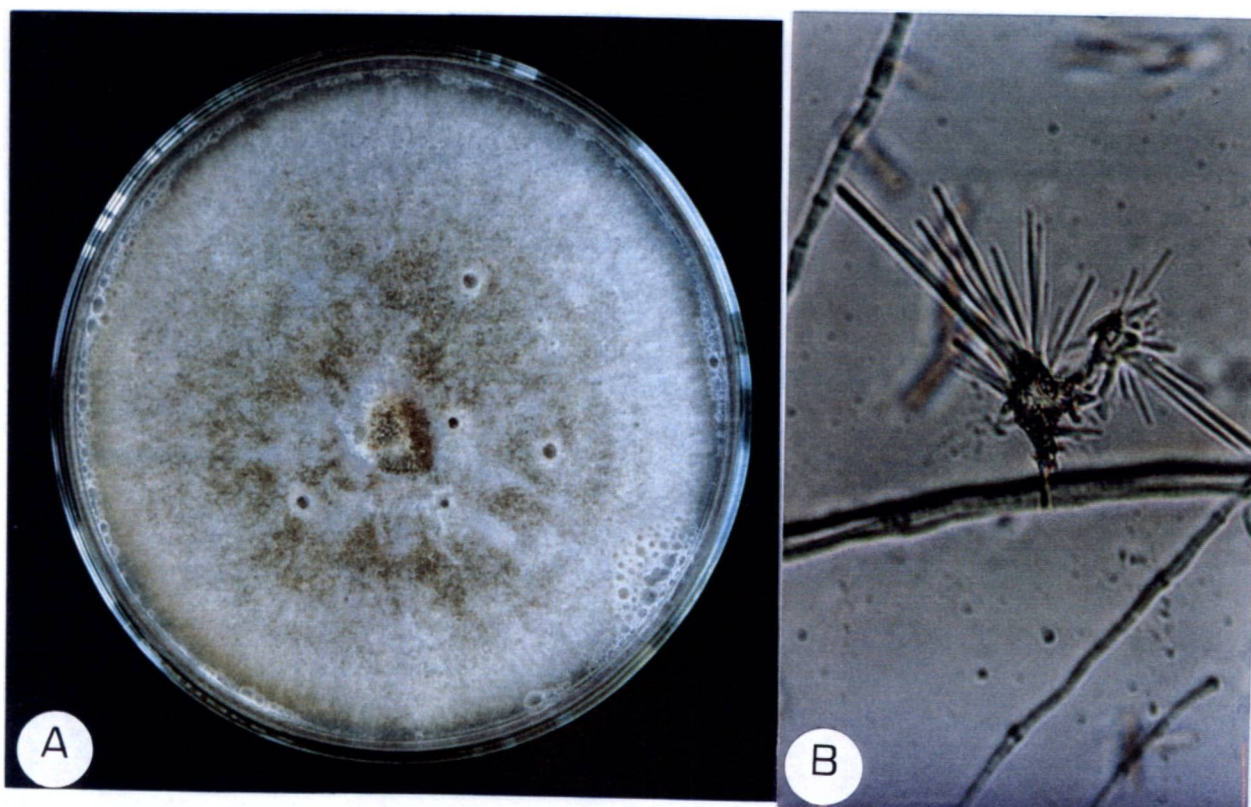


FIGURA 14 - A - COLÔNIA DE *Scopulariopsis* sp., ISOLADO DO COLMO DA PARTE INFERIOR DA PLANTA DO MILHO DO CAMPO AOS 40 DIAS A 28°C EM MEIO BDA. B - FOTOMICROGRAFIA DE *Scopulariopsis* sp. MOSTRANDO LONGAS CADEIAS DE CONÍDIOS (AUMENTO 400X).

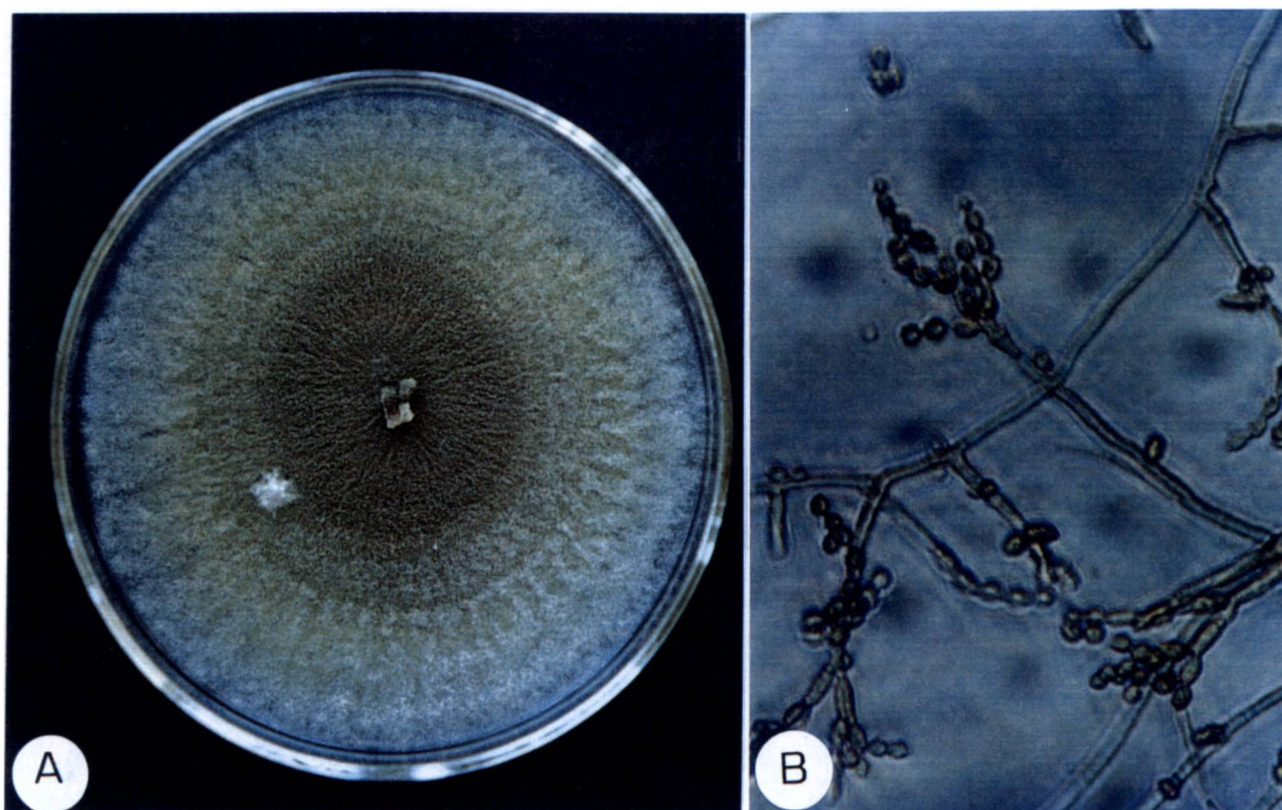
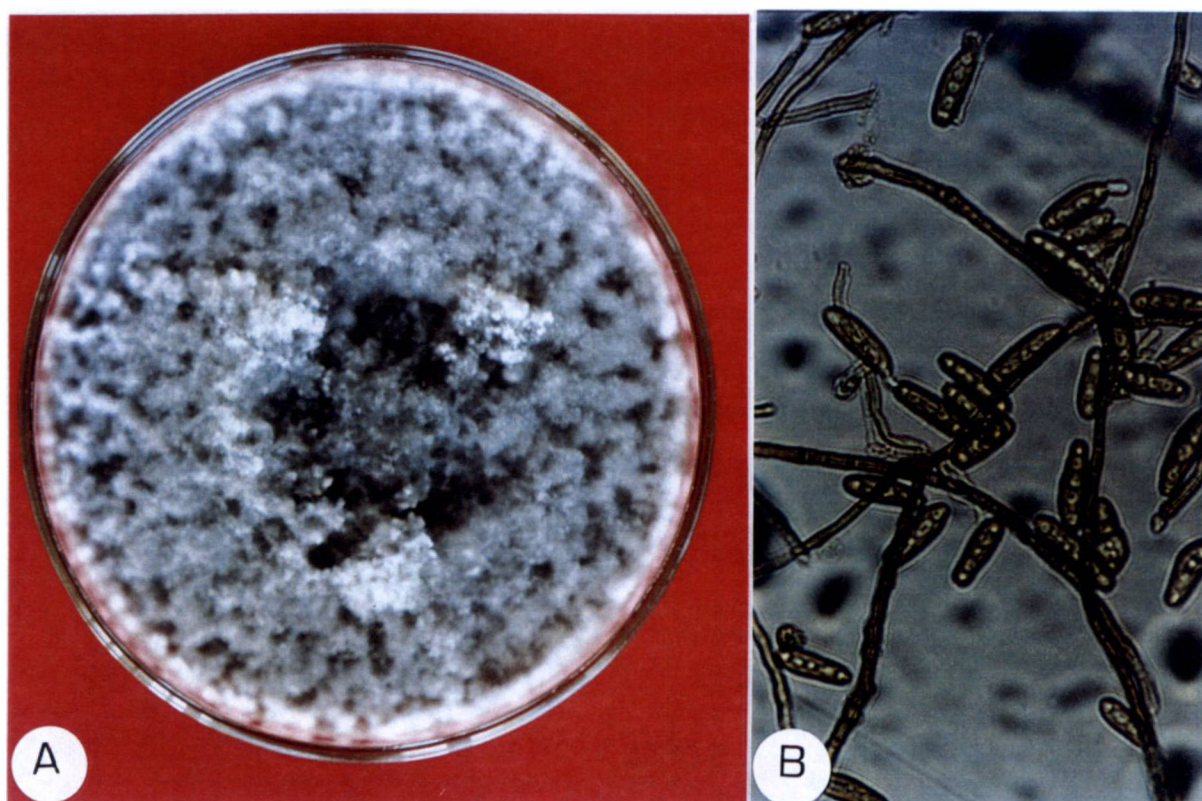


FIGURA 15 - A - COLÔNIA DE *Drechslera* sp., ISOLADO DO COLMO DA PARTE INFERIOR DA PLANTA DO MILHO DO CAMPO AOS 40 DIAS A 28°C EM MEIO AA. B - FOTOMICROGRAFIA DE *Drechslera* sp., DISPOSIÇÃO SIMPODIAL DE MACROCONÍDIOS MULTICELULARES AO LONGO DE UM CONIDIÓFORO (AUMENTO DE 400x).



Fungos dematiáceos constituem um grupo grande e heterogêneo, cuja principal característica é a pigmentação escura na parede celular das células vegetativas e reprodutivas. Esse pigmento na maioria das vezes, é a melanina (diidroxinaftaleno-melanina) que, além de ser um pigmento fotoprotetor (permite ao fungo desenvolver-se em ambientes expostos à luz solar), parece constituir um dos fatores de virulência desses agentes (VICENTE, 2000).

Os fungos dematiáceos encontram-se amplamente distribuídos entre as divisões Zigomicota, Ascomicota, Basidiomicota e Deuteromicota. Estruturas morfológicas associadas à características do crescimento são critérios importantes, possibilitando o agrupamento de alguns gêneros (VICENTE, 2000).

O desenvolvimento filamentosos é caracterizado por colônias de aspecto escuro (marrom, verde oliva ou negras) onde microscopicamente observam-se hifas com septos escuros. Muitas espécies são sapróbias e de crescimento rápido, enquanto outras patogênicas desenvolvem-se lentamente em meios de cultura definidos (VICENTE, 2000).

Neste trabalho foram isolados tanto no milho como na soja fungos dematiáceos onde enquadram-se vários gêneros sabidamente endofíticos como *Alternaria* sp., *Chaetomium* sp., *Curvularia* sp. e *Cladosporium* sp. que também foram encontrados em trabalhos realizados por FISHER, PETRINI e LAPPIN SCOTT (1992) em plantas de milho. Fungos endofíticos dematiáceos como *Alternaria* sp., *Curvularia* sp. e *Drechslera* sp. foram isolados de *Stylosanthes guianensis* por PEREIRA, AZEVEDO e PETRINI, 1993; em cevada por SCHULZ et al.(1998) e em eucalipto por BERTONI e CABRAL (1988).

FIGURA 16 - A - COLÔNIA DE *Colletotrichum* sp., ISOLADO DO COLMO DA PARTE SUPERIOR DA PLANTA DO MILHO DE CASA DE VEGETAÇÃO AOS 20 DIAS A 28°C EM MEIO BDA. B - CONÍDIOS DE *Colletotrichum* sp. LIGEIRAMENTE AFILADOS, CURVOS, UNICELULARES E HIALINOS, SAINDO ISOLADAMENTE DE CONIDIÓFOROS (AUMENTO DE 400X).

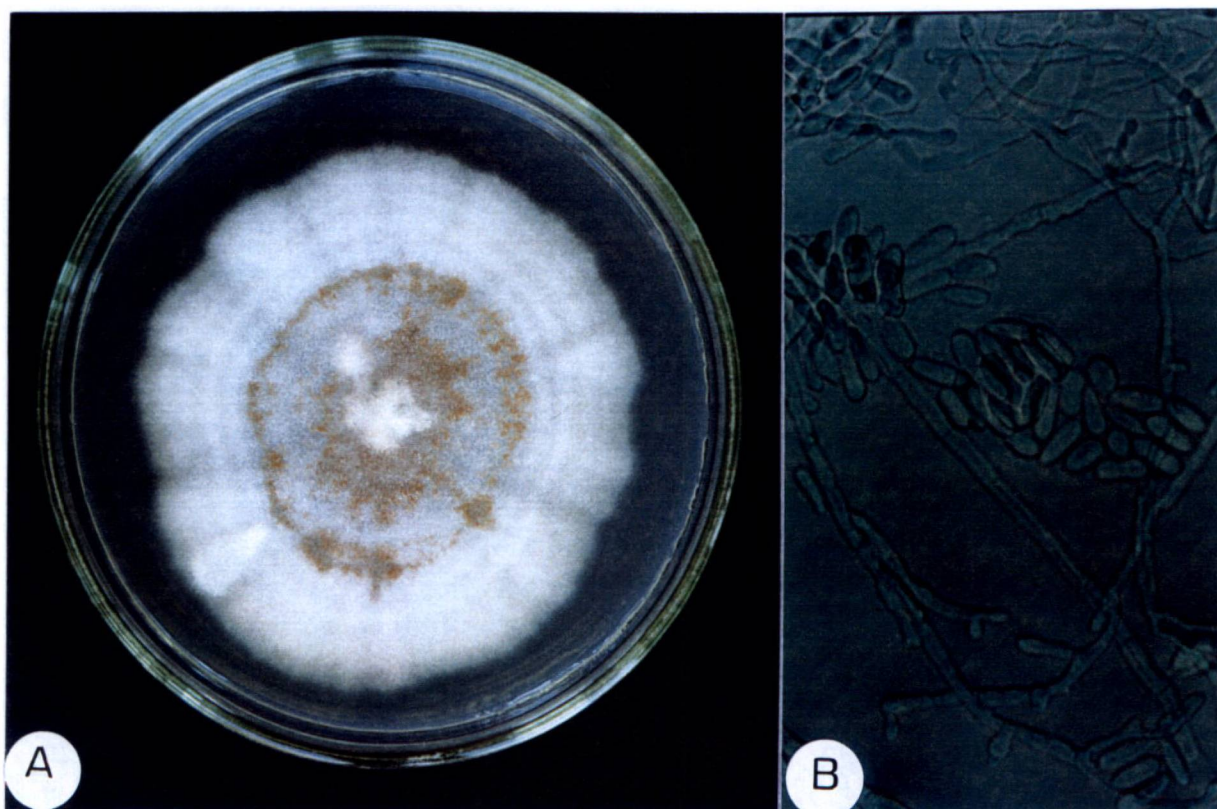


FIGURA 17 - A- COLÔNIA DE *Fusarium* sp., ISOLADO DA FOLHA DA PARTE INFERIOR DA PLANTA DE SOJA DO CAMPO AOS 40 DIAS A 28°C EM MEIO AFA B - CONÍDIOS GRANDES DE *Fusarium* sp., CURVADOS E SEPTADOS COM FORMATO DE CANOA (AUMENTO DE 400X)

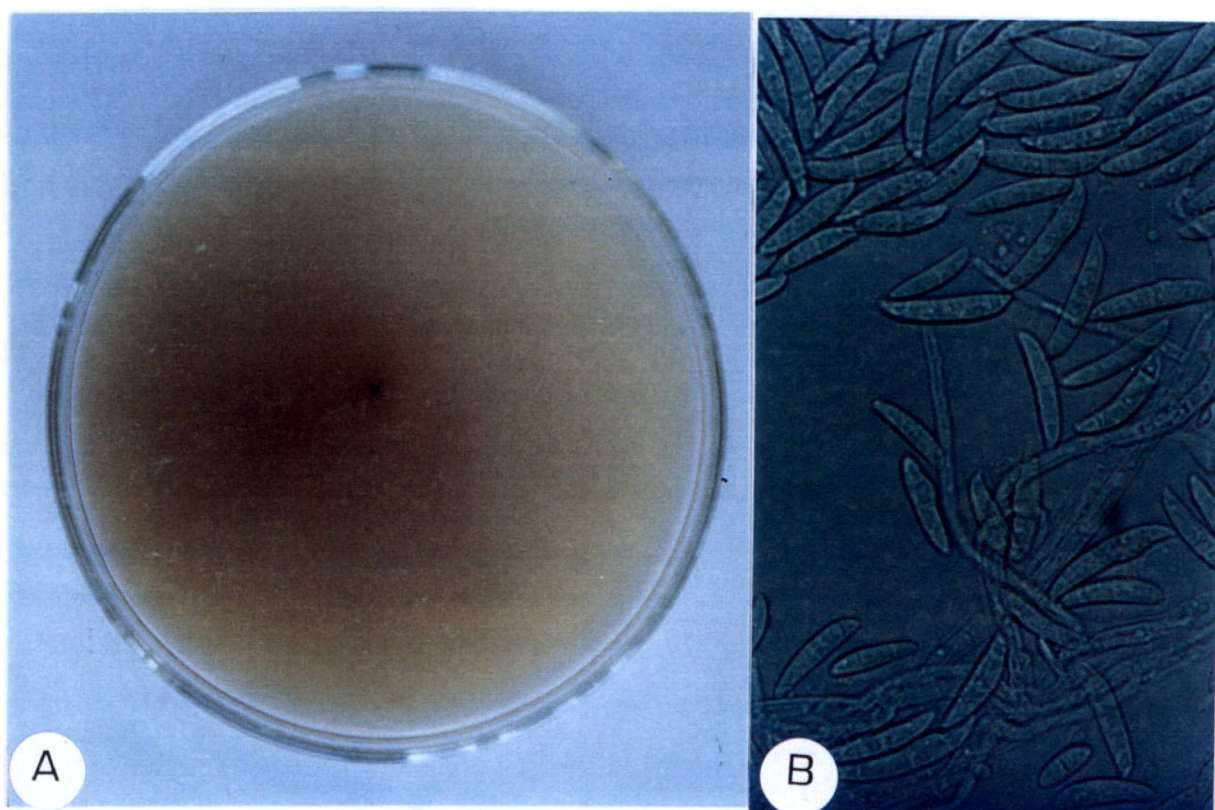


FIGURA 18 - A - COLÔNIA DE *Acremonium* sp., ISOLADO DA FOLHA DA PARTE SUPERIOR DA PLANTA DO MILHO DO CAMPO AOS 40 DIAS A 37°C EM MEIO BDA. B - CONÍDOS ELÍPTICOS DE *Acremonium* sp. NAS PONTAS DE FIÁLIDES DELICADAS (AUMENTO DE 400X).

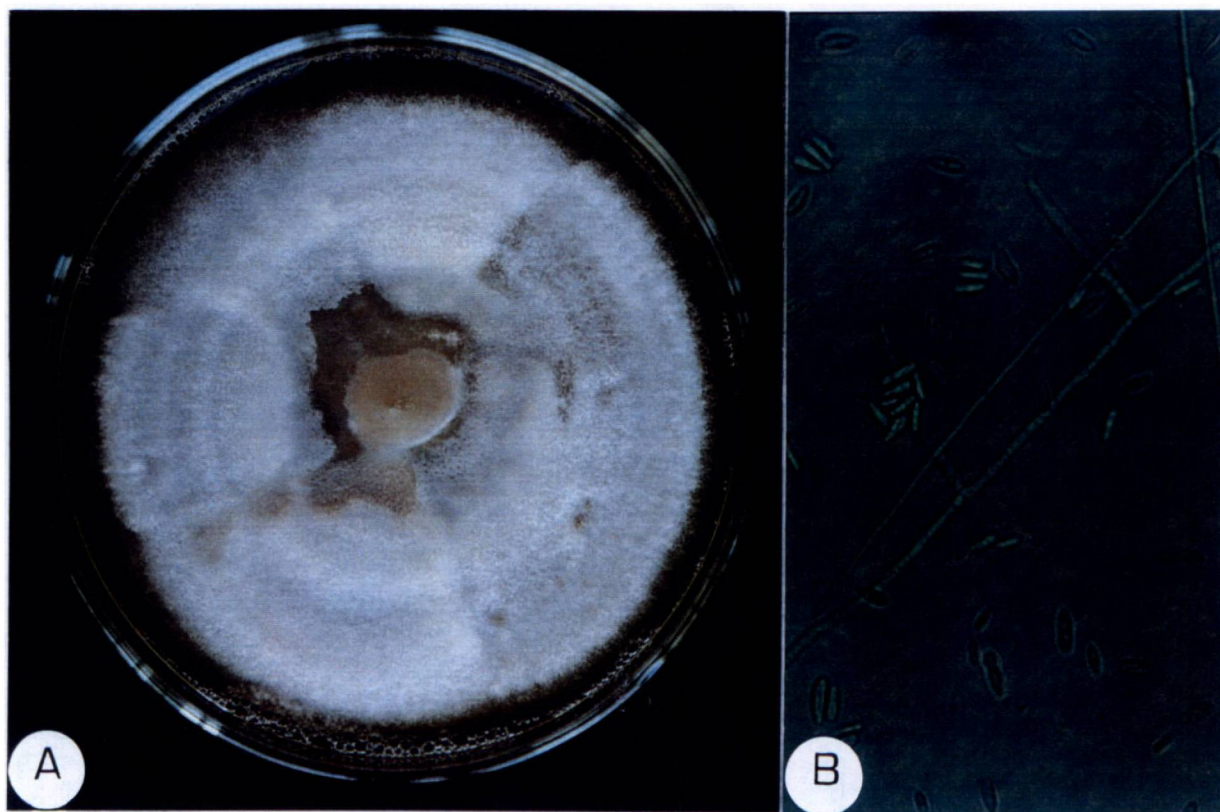


FIGURA 19 - A - COLÔNIA DE *Aspergillus niger*. ISOLADO DO COLMO DA PARTE INFERIOR DA PLANTA DO MILHO DE CASA DE VEGETAÇÃO AOS 20 DIAS A 37°C EM MEIO BDA. B - CABEÇA DE *Aspergillus niger*, UMA FILEIRA DE FIÁLIDES COM ESPORULAÇÃO NOS TERÇOS SUPERIORES DAS VESÍCULAS (AUMENTO DE 400X)

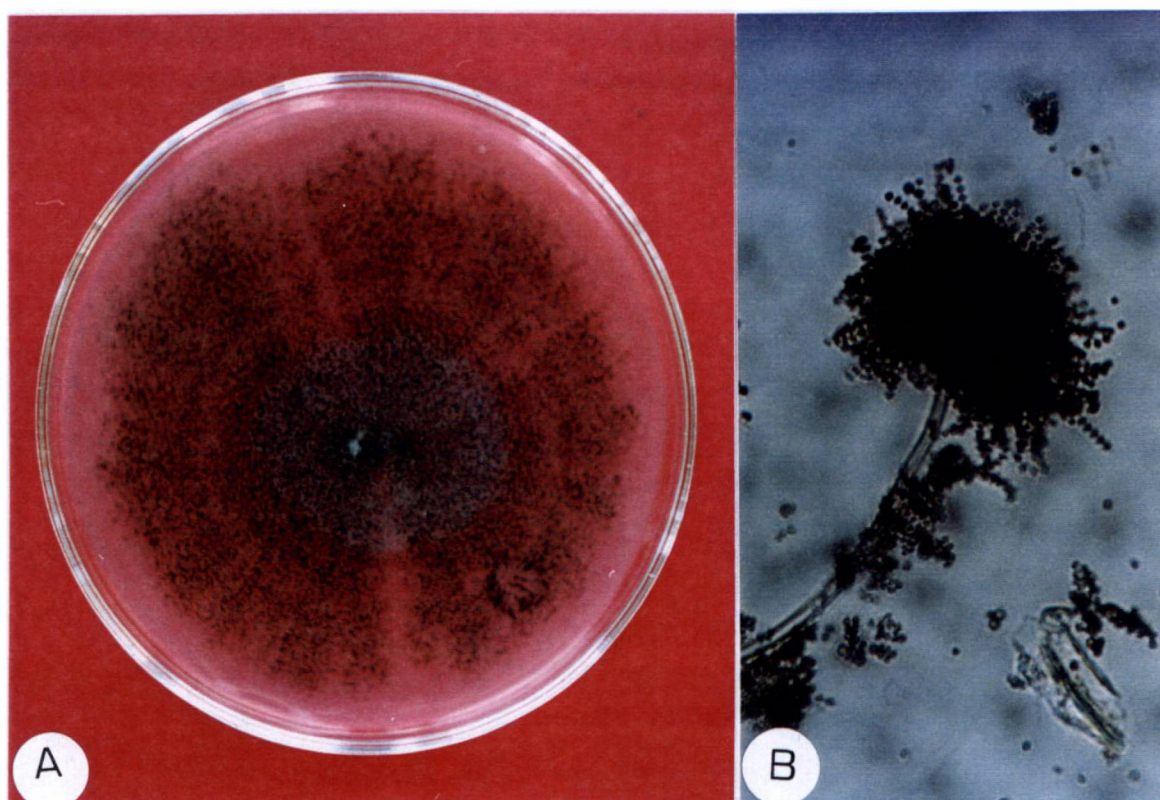


FIGURA 20 - A - COLÔNIA DE *Penicillium* sp., ISOLADO DO COLMO DA PARTE INFERIOR DA PLANTA DO MILHO DE CASA DE VEGETAÇÃO A 28°C EM MEIO AA. B - HIFAS SEPTADAS DE *Penicillium* sp. COM MÉTULAS RAMIFICADAS COM FIÁLIDES DE ONDE DERIVAM CADEIAS DE CONÍDIOS (AUMENTO DE 400X)

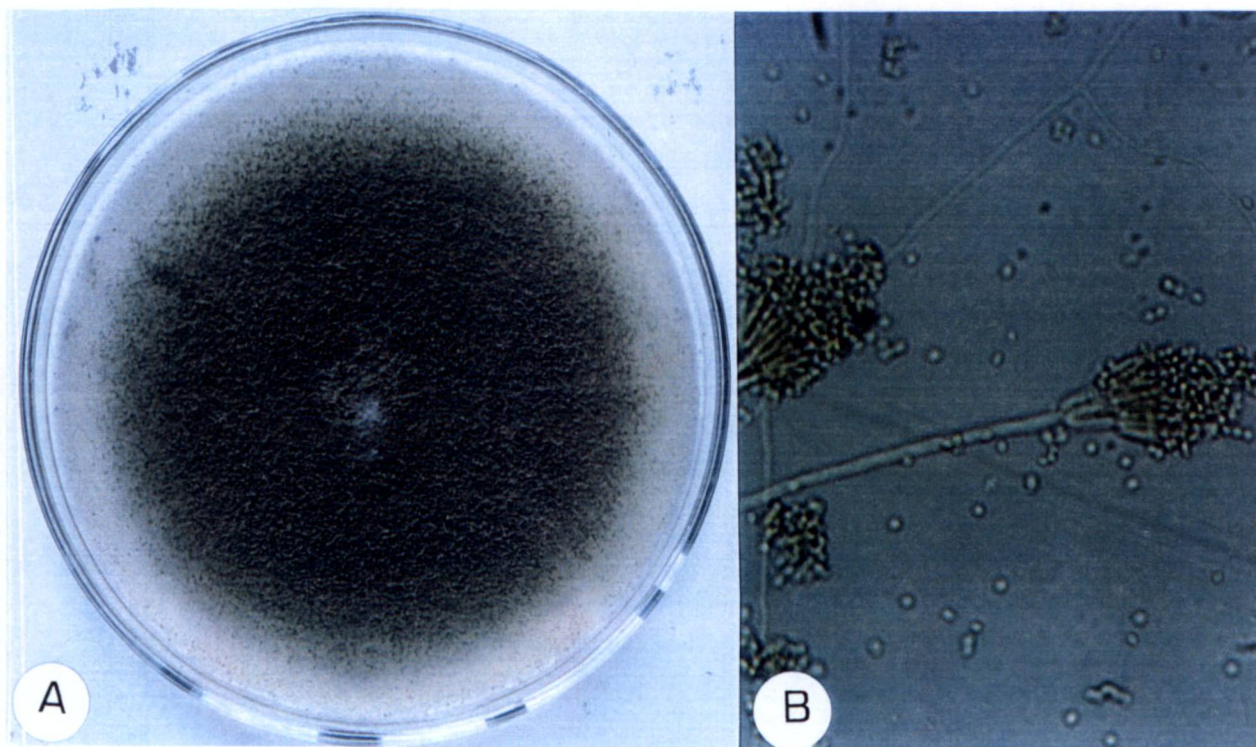
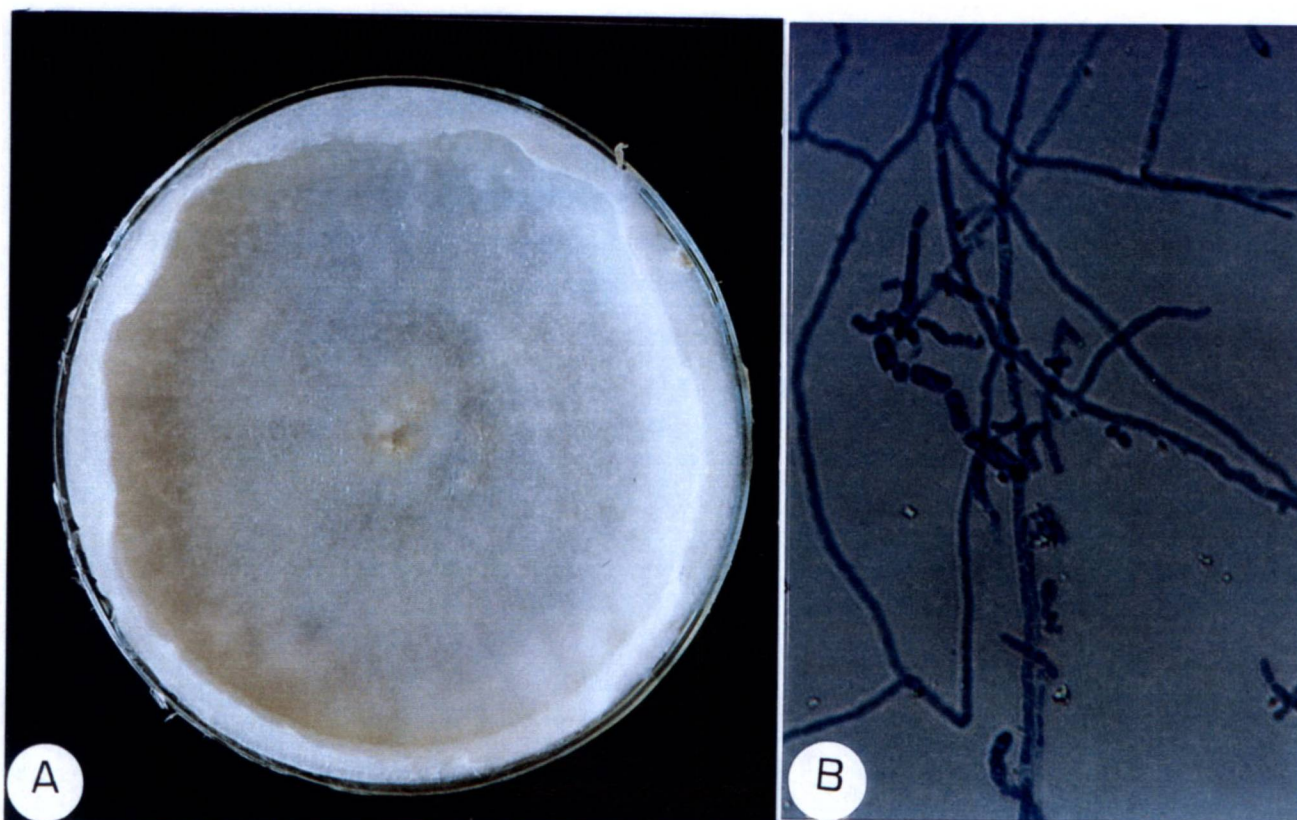


FIGURA 21 - A - COLÔNIA DE *Mycelia sterilia*, ISOLADO DA FOLHA DA PARTE SUPERIOR DA PLANTA DO MILHO DO CAMPO AOS 20 DIAS A 28°C EM MEIO AA. B - HIFAS SEPTADAS DE *Mycelia sterilia* (AUMENTO DE 400X).



Os gêneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Acremonium* sp., *Beauveria* sp. e *Paecilomyces* sp. pertencem a divisão Deuteromycotina, à classe dos Hiphomycetes, à ordem Hyphomycetales e à família Moniliaceae e se caracterizam por possuírem conidióforos livres ou reunidos formando sinêmios ou esporodóquios e conídios hialinos ou brilhantes e coloridos. *Penicillium* sp. é cosmopolita e ocorre em abundância no ar e no solo; muitas espécies são patógenos importantes de frutas, bulbos e grãos armazenados (SILVEIRA, 1995). *Aspergillus* sp. é amplamente difundido e utiliza os mais variados substratos; existem várias espécies que ocorrem em sementes, principalmente armazenadas, podendo prejudicar a germinação, e é também encontrado sobre insetos na fase assexual, sendo um ascomiceto na forma perfeita (sexual) (ALVES, 1998).

O gênero *Acremonium* sp. cuja fase sexual pode se apresentar como *Nectria*, *Cordyceps* etc. já foi encontrado atacando hemípteros, formigas, besouros, larvas de lepidópteros e coccídeos (ALVES, 1998).

Dentro da classe dos Hiphomycetes na ordem Tuberculariales e na família Tuberculariaceae encontra-se o gênero *Fusarium* sp. que se caracteriza por apresentar conidióforos em forma de esporodóquio reunidos uns aos outros e conídios hialinos. Trata-se de um gênero muito amplo que ocorre em plantas e insetos, podendo também atuar como agente secundário de doenças (ALVES, 1998).

O gênero *Colletotrichum* sp. pertence a classe dos Coleomycetes, ordem Melanconiales, família Melanconiaceae e que se caracteriza por seu micélio interno e por não possuírem picnídios; a sua frutificação é constituída por estroma subepidérmico no qual se desenvolvem os conidióforos e conídios; esta massa é delimitada pela epiderme rompida e o conjunto é denominado de acérvulo. Este gênero se caracteriza por ser um dos principais agentes da antracnose (SILVEIRA, 1995).

Alguns Hiphomycetes como *Cladosporium* spp., *Beauveria*, *Metharizium* spp., *Nomurea rileyi* e *Verticillium lecanii* têm apresentado uma grande potencialidade de emprego no controle biológico aplicado, pois esses entomopatógenos, além de possuírem um ciclo de saprogênese que mantém um inóculo viável em substratos orgânicos, possuem conídios persistentes e viáveis na área de influência do inseto

praga (ROBBS e BITENCOURT, 1998).

Os gêneros *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Mycelia sterilia* encontrados em milho e soja neste trabalho, já foram isolados de outros hospedeiros como endófitos em *Stylosanthes guianensis* por PEREIRA, 1993 (*Colletotrichum gloeosporioides*), em banana por PEREIRA, VIEIRA e AZEVEDO, 1999 (*Colletotrichum musae* e *Fusarium* sp.), em soja por HARTMAN, MANANDHAR e SINCLAIR, 1986 (*Colletotrichum* spp.). SCHULZ et al. (1998) isolaram de folhas, caules e raízes de cevada como endófitos os gêneros *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Mycelia sterilia*, e em milho estes mesmos gêneros foram encontrados por FISHER, PETRINI e LAPPIN SCOTT, 1992; SOUZA e AZEVEDO, 1995 e PAMPHILE, 1997.

FIGURA 22 - A- COLÔNIA DE *Beauveria* sp., ISOLADO DO COLMO DA PARTE SUPERIOR DA PLANTA DO MILHO EM CASA DE VEGETAÇÃO AOS 20 DIAS A 28°C EM MEIO BDA. B - CONÍDOS OVAIS E ELIPSÓIDES DE *Beauveria* sp. (AUMENTO DE 400X).

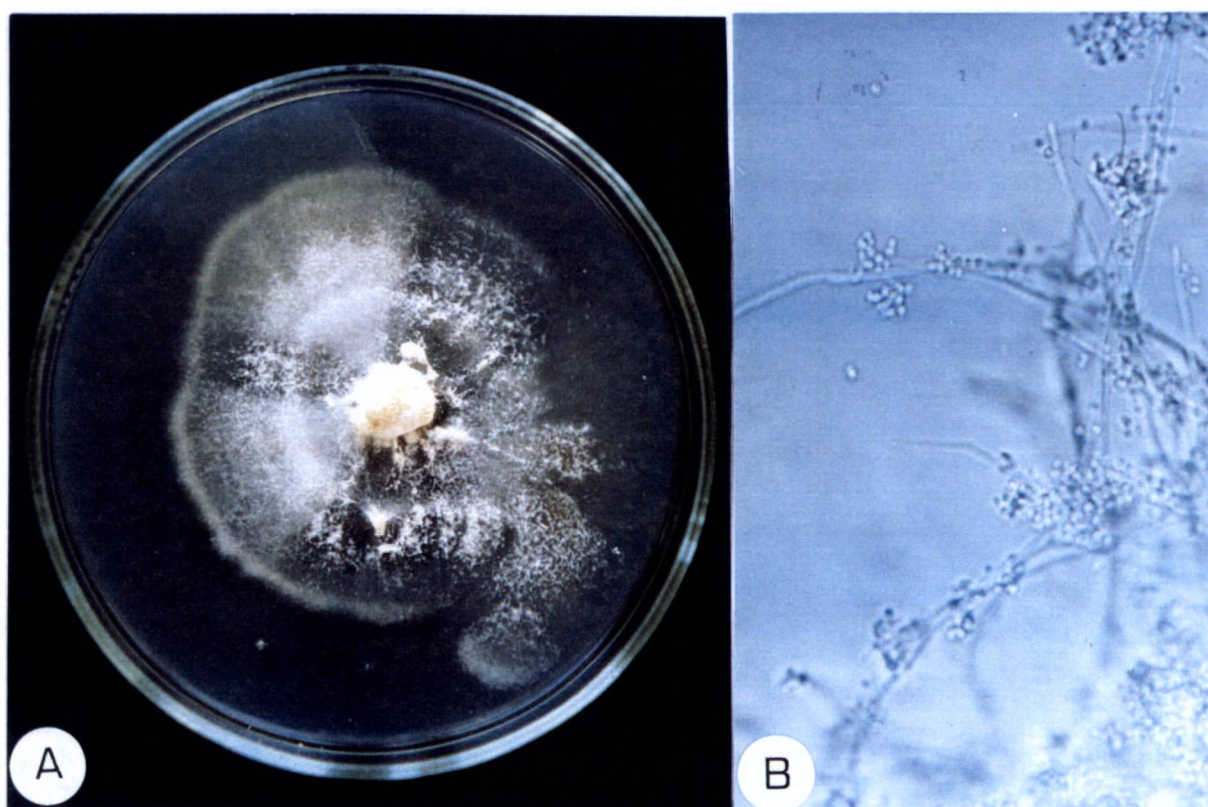


FIGURA 23 - CONÍDOS GLOBOSOS OU SUBGLOBOSOS COM CONIDIÓFOROS FORMANDO DENSOS CACHOS DE *Beauveria* sp.. FIÁLIDES COM A PARTE BASAL DILATADA TERMINANDO EM ZIGUEZAGUE BEM DEFINIDOS (MEV- AUMENTO DE 4986X, BARRA = 10 $\mu$ m).

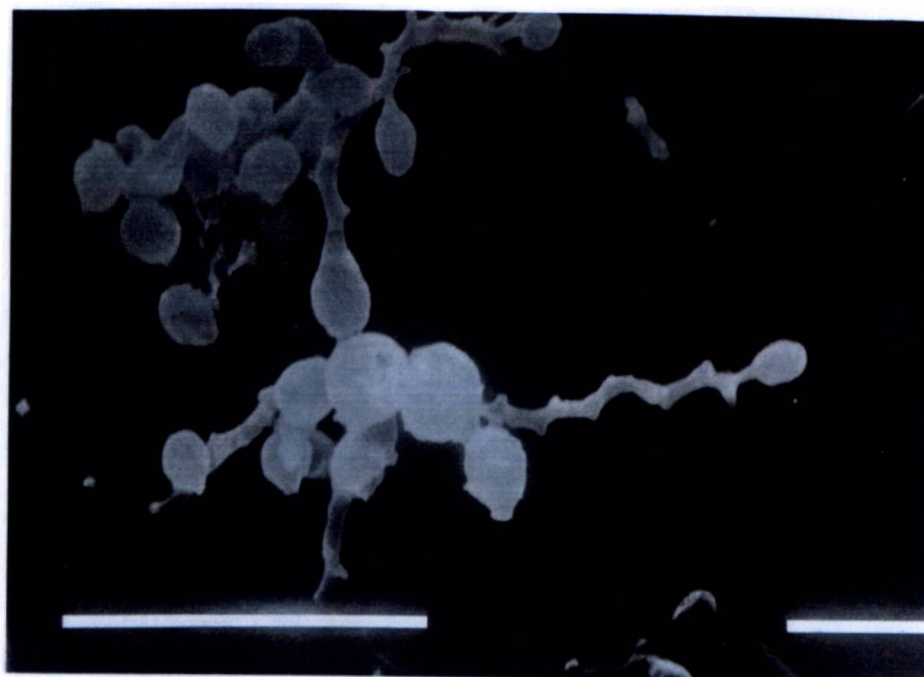


FIGURA 24 - A- COLÔNIA DE *Paecilomyces* sp.. ISOLADO DA FOLHA DA PARTE INFERIOR DA PLANTA DA SOJA DO CAMPO AOS 20 DIAS A 28°C EM MEIO BDA. B - CONIDIÓFOROS SIMPLES DE *Paecilomyces* sp OU EM SINEMAS VERTICILADOS SUSTENTANDO AS FIÁLIDES (AUMENTO 400X).

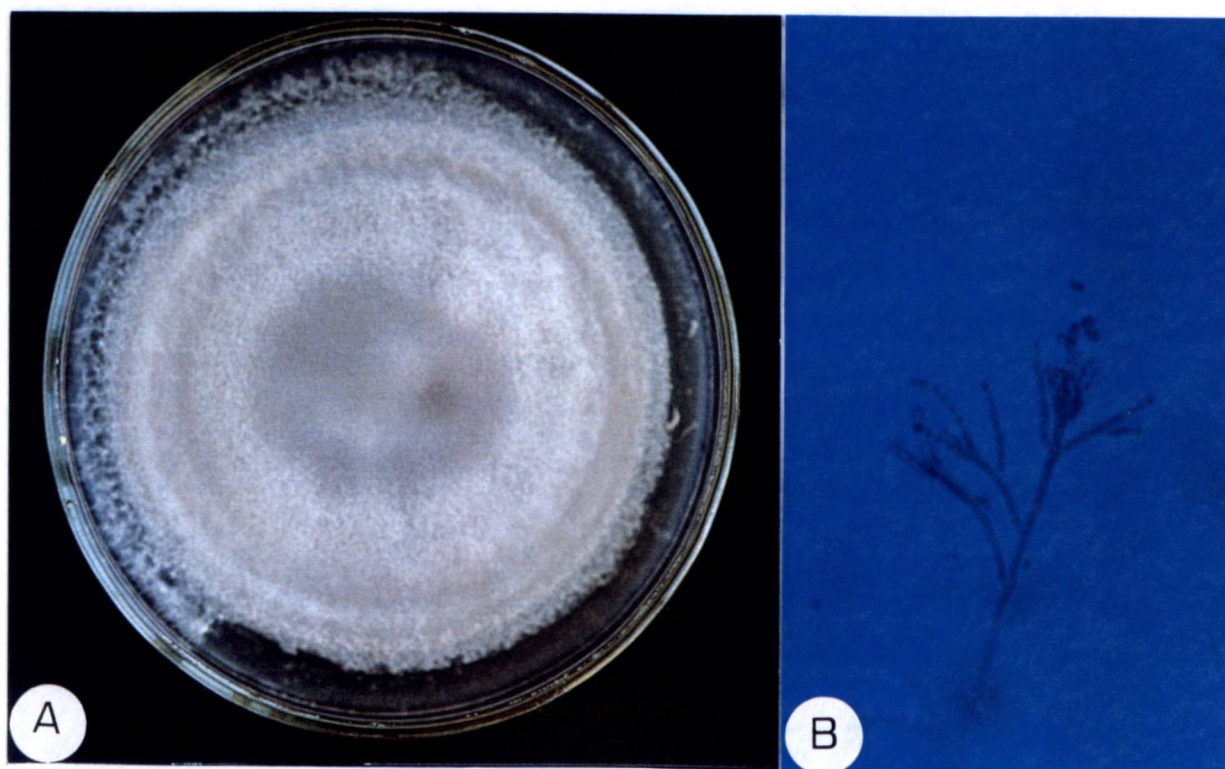


FIGURA 25 - CONIDIÓFOROS SIMPLES OU EM SINEMA DE *Paecilomyces* sp. VERTICILADOS E SUSTENTANDO FIÁLIDES COM PESCOÇO, CONÍDIOS ELÍPTICOS UNICELULARES (MEV-AUMENTO DE 2575X, BARRA = 10µm)



O gênero endofítico entomopatogênico *Beauveria* sp. é um Hifomiceto ou fungo imperfeito que caracteriza-se pela ausência do teleomorfo (forma perfeita ou sexuada) no seu ciclo e pertence a divisão dos Deuteromicetos. *Beauveria* sp. é parasito de um grande número de artrópodos, ocorrendo em mais de 200 espécies de insetos e ácaros, incluindo carrapatos e em amostras de solo, onde pode persistir por longo tempo em saprogênese. Os indivíduos atacados apresentam-se cobertos por micélio branco que esporula em condições adequadas de umidade e luz. As fiálides são representadas por células com a região basal mais volumosa e se organizam nos conidióforos, densamente agrupadas em espirais ou solitárias. Os conídios globosos, ovóides, cilíndricos, verrugosos, curvados ou não, aparecem sobre as hastes das fiálides que podem ser simples, com algumas ramificações na parte superior ou em ziguezague (ALVES, 1998).

BING e LEWIS (1993) demonstraram que *Beauveria bassiana* é indígena do agrossistema do milho, ocorre naturalmente em diferentes sistemas de cultivo e quando injetado na planta protege o milho contra o ataque de *Ostrinia nubilalis*. Estes autores relataram que a relação endofítica entre *Beauveria* é única comparando-se com outras relações plantas/fungos.

O gênero *Paecilomyces* reúne diversas espécies entomopatogênicas como *P. farinosus*, *P. fumosoroseus*, *P. lilacinus* etc. Os conidióforos são simples ou em sinema, verticilados e sustentando fiálides com pescoço. Os conídios podem ser elípticos unicelulares, hialinos ou fracamente pigmentados e as colônias, dependendo da espécie e meio, têm coloração geral branca, amarela, rosa ou avermelhada. Relatos deste fungo como endofítico foram feitos por SCHULZ et al. (1998) em cevada e em *Alnus* por FISHER e PETRINI em 1990.

#### 4.4 Fungos endofíticos do milho (*Zea mays* L.)

Os dados relativos ao número e porcentagem de fungos endofíticos isolados e identificados do milho no campo estão apresentados na Tabela 12 e os dados relativos à casa de vegetação na Tabela 13.

Foi observada significância a nível de pelo menos 5% do fator gênero, o que significa que pelo menos um (1) entre os nove (9) é diferente dos demais, ou seja, no milho os nove grupos não foram isolados com a mesma frequência, nem foram igualmente distribuídos nas diferentes condições de isolamento. Foram significativas as interações envolvendo gêneros x origem; gêneros x idade das plantas; gêneros x temperaturas e gêneros x órgãos das plantas (Anexo 3).

Assim, para facilitar a discussão, os dados de campo e casa de vegetação foram apresentados separadamente nas Tabelas 12 e 13 e nos Anexos de 4 a 11.

No campo (Tabela 12) os grupos encontrados em maior frequência foram os dematiáceos e *Fusarium* sp., e quando comparou-se suas médias pelo Teste de Tukey não houve diferença significativa entre os dois, mas o primeiro foi diferente dos demais (Anexo 4). Já na casa de vegetação, o gênero *Colletotrichum* sp. foi isolado em maior frequência, porém pelo Teste de Tukey não diferiu de *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. (Figura 26 e Anexo 5).

FIGURA 26 - NÚMERO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DO MILHO EM CAMPO E CASA DE VEGETAÇÃO.

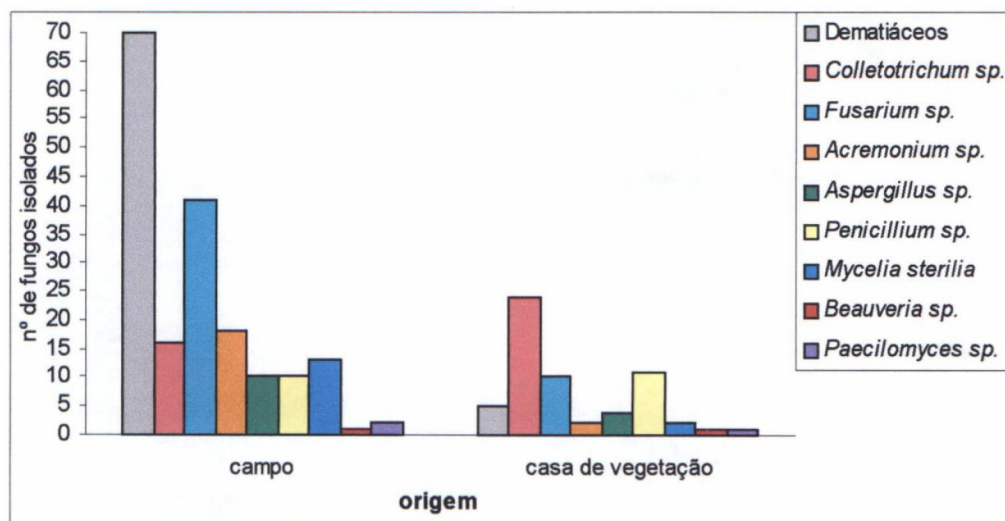


TABELA 12 – NÚMERO E PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO TOTAL DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DO MILHO DO CAMPO CONSIDERANDO DIFERENTES IDADES, TEMPERATURAS, ÓRGÃOS DAS PLANTAS, PARTES DAS PLANTAS E MEIOS DE CULTURA.

CAMPO	Dematiáceos		<i>Colletotrichum sp</i>		<i>Fusarium sp.</i>		<i>Acremonium sp.</i>		<i>Aspergillus sp</i>		<i>Penicillium sp.</i>		<i>Mycelia sterilia</i>		<i>Beauveria sp.</i>		<i>Paecilomyces sp.</i>		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
20 dias	19	25,68	0	0,00	23	31,08	10	13,51	9	12,16	4	5,40	8	10,82	0	0,00	1	1,35	74	40,88
40 dias	51	47,67	16	14,95	18	16,82	8	7,48	1	0,93	6	5,61	5	4,68	1	0,93	1	0,93	107	59,12
28°C	48	38,10	8	6,35	33	26,19	14	11,11	7	5,55	7	5,55	8	6,35	0	0,00	1	0,80	126	69,61
37°C	22	40,00	8	14,54	8	14,54	4	7,28	3	5,45	3	5,45	5	9,09	1	1,81	1	1,81	55	30,39
Colmo	7	9,86	11	15,49	28	39,44	5	7,04	7	9,86	6	8,45	6	8,45	0	0,00	1	1,41	71	39,27
Folha	63	57,27	5	4,54	13	11,82	13	11,82	3	2,73	4	3,63	7	6,36	1	0,91	1	0,91	110	60,77
CPIP*	5	17,86	6	21,43	10	35,71	3	10,71	1	3,57	2	7,14	1	3,57	0	0,00	0	0,00	28	15,47
CPSP**	2	4,65	5	11,63	18	41,86	2	4,65	6	13,95	4	9,30	5	11,63	0	0,00	1	2,33	43	23,76
FPIP***	31	55,36	1	1,79	11	19,64	5	8,93	1	1,78	2	3,57	4	7,14	1	1,79	0	0,00	56	30,93
FPSP****	32	59,26	4	7,41	2	3,70	8	14,82	2	3,70	2	3,70	3	5,55	0	0,00	1	1,85	54	29,83
AA	22	32,84	12	17,91	12	17,91	9	13,43	1	1,49	3	4,48	7	10,45	0	0,00	1	1,49	67	37,02
BDA	31	37,35	1	1,21	23	27,71	6	7,23	7	8,43	7	8,43	6	7,23	1	1,21	1	1,20	83	45,86
AFA	17	54,84	3	9,68	6	19,35	3	9,68	2	6,45	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	31	17,13
	70		16		41		18		10		10		13		1		2		181	

CPIP\* - colmo da parte inferior da planta  
 CPSP\*\* - colmo da parte superior da planta

FPIP\*\*\* - folha da parte inferior da planta  
 FPSP\*\*\*\* - folha da parte superior da planta

TABELA 13 - NÚMERO E PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO TOTAL DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DO MILHO DA CASA DE VEGETAÇÃO CONSIDERANDO DIFERENTES IDADES, TEMPERATURAS, ÓRGÃOS DAS PLANTAS, PARTES DAS PLANTAS E MEIOS DE CULTURA

C.V.	Dematiáceos		<i>Colletotrichum</i> sp.		<i>Fusarium</i> sp.		<i>Acremonium</i> sp.		<i>Aspergillus</i> sp.		<i>Penicillium</i> sp.		<i>Mycelia sterilia</i>		<i>Beauveria</i> sp.		<i>Paecilomyces</i> sp.		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
20 dias	4	7,55	23	43,40	7	13,21	2	3,77	4	7,55	9	16,98	2	3,77	1	1,88	1	1,88	53	88,33
40 dias	1	14,28	1	14,28	3	42,86	0	0,00	0	0,00	2	28,57	0	0,00	0	0,00	0	0,00	7	11,67
28°C	5	13,16	16	42,11	9	23,68	1	2,63	1	2,63	3	7,90	2	5,26	1	2,63	0	0,00	38	63,33
37°C	0	0,00	8	36,37	1	4,54	1	4,54	3	13,64	8	36,37	0	0,00	0	0,00	1	4,54	22	36,67
Colmo	2	4,65	21	48,84	3	6,98	2	4,65	3	6,98	8	18,61	2	4,65	1	2,32	1	2,32	43	71,67
Folha	3	17,65	3	17,65	7	41,17	0	0,00	1	5,88	3	17,65	0	0,00	0	0,00	0	0,00	17	28,33
CPIP*	2	11,77	9	52,94	0	0,00	1	5,88	1	5,88	3	17,65	1	5,88	0	0,00	0	0,00	17	28,33
CPSP**	0	0,00	12	46,15	3	11,53	1	3,85	2	7,69	5	19,23	1	3,85	1	3,85	1	3,85	26	43,33
FPIP***	3	25,00	2	16,67	4	33,33	0	0,00	0	0,00	3	25,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	12	20,00
FPSP****	0	0,00	1	20,00	3	60,00	0	0,00	1	20,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	5	8,33
AA	1	5,26	7	36,85	3	15,79	0	0,00	2	10,53	5	26,31	1	5,26	0	0,00	0	0,00	19	31,67
BDA	2	8,70	7	30,44	2	8,70	2	8,70	2	8,70	5	21,74	1	4,34	1	4,34	1	4,35	23	38,33
AFA	2	11,11	10	55,56	5	27,78	0	0,00	0	0,00	1	5,55	0	0,00	0	0,00	0	0,00	18	30,00
	5		24		10		2		4		11		2		1		1		60	

CPIP\* - colmo da parte inferior da planta  
 CPSP\*\* - colmo da parte superior da planta

FPIP\*\*\* - folha da parte inferior da planta  
 FPSP\*\*\*\* - folha da parte superior da planta

Considerando as interações entre gêneros e origens, no campo foram isolados em maior porcentagem os fungos dematiáceos, o que não aconteceu na casa de vegetação (Tabela 13 e Figura 26). Os dados obtidos neste trabalho com o milho concordam com os de FISHER, PETRINI e LAPPIN SCOTT (1992) que, trabalhando com distribuição de fungos e bactérias endofíticas em milho encontraram alguns fungos dematiáceos como *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *Chaetomium* sp., *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) DeVries, *Cladosporium tenuissimum* Cooke e espécies de *Fusarium graminearum* Schwabe, *Fusarium oxysporum* Schlecht. e *Acremonium strictum* W. Gams, que também foram isoladas neste trabalho (Figuras 10, 13, 11, 17 e 18).

Fungos endofíticos dematiáceos como *Alternaria* sp., *Curvularia* sp., *Drechslera* sp. e *Colletotrichum dematium* foram encontrados por PEREIRA et al. 1993, em folhas de *Stylosanthes guianensis*.

Em um estudo comparativo de fungos endofíticos em espécies de *Alnus* FISHER e PETRINI (1990) encontraram, na casca e no xilema, alguns fungos dematiáceos como *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link e *Cladosporium gloeosporioides* (Penz) Penz e Sacc. e também o fungo *Paecilomyces marquandii* (Masse) Hughes.

Em milho foram encontrados alguns fungos endofíticos dematiáceos dos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Drechslera* e os fungos endofíticos *Acremonium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mycelia sterilia* e *Paecilomyces*. Estes dados estão de acordo com o trabalho realizado por SCHULZ et al.(1998) que, estudando a interação endófito-hospedeiro, isolaram estes mesmos gêneros em folhas, caules e raízes de cevada.

Cabe ressaltar que os gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Mycelia sterilia* isolados de milho neste trabalho são fungos representativos de plantas tropicais e endófitos de diferentes hospedeiros (PEREIRA, AZEVEDO e PETRINI, 1993; RODRIGUES e REDMANN, 1997; PEREIRA, VIEIRA e AZEVEDO, 1999).

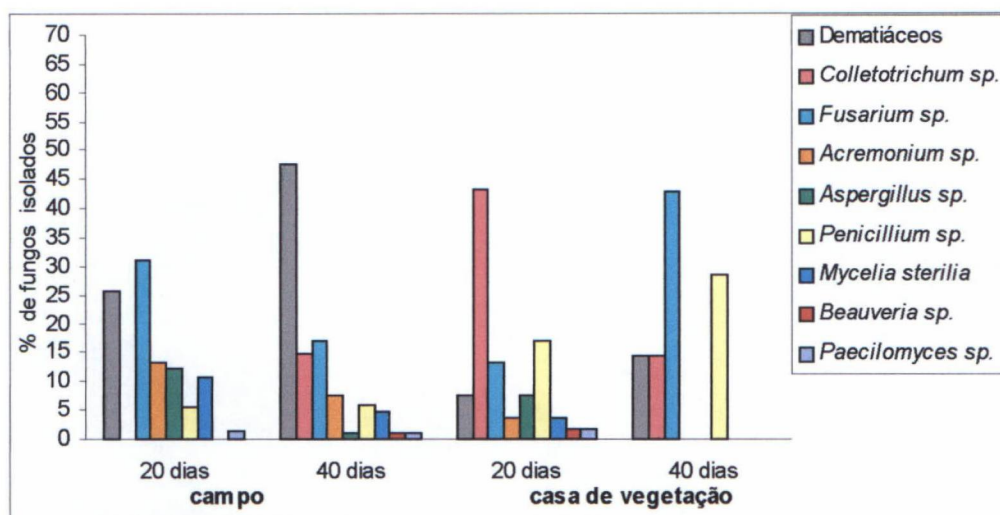
Assim, devido à diferença encontrada no número de fungos dematiáceos em condições de campo e casa de vegetação, pode-se levantar a hipótese de que estes

fungos dematiáceos foram transmitidos via semente e que a menor taxa de infecção encontrada em casa de vegetação talvez se deva a condições ambientais desfavoráveis na mesma, como por exemplo a temperatura elevada, o que pode ter impedido que estes fungos colonizassem a planta; outra hipótese seria que estes fungos dematiáceos tem como característica a pigmentação escura na parede celular das células vegetativas e reprodutivas, esse pigmento que na maioria das vezes é a melanina (diidroxinaftaleno-melanina) pode funcionar como um pigmento fotoprotetor (permite ao fungo desenvolver-se em ambientes expostos à luz solar), e constituir-se um dos fatores de virulência desses agentes (VICENTE, 2000).

Em relação à interação gêneros e idade das plantas, observou-se que aos 20 dias em material isolado do campo, houve uma porcentagem maior de infecção com fungos dematiáceos e do gênero *Fusarium* sp., e essa porcentagem permaneceu até a idade da planta de 40 dias (Tabela 12 e Figura 27). Em condições de casa de vegetação aos 20 dias a frequência de infecção dentre todos os isolados foi maior para os gêneros *Colletotrichum* sp. e *Penicillium* sp.; já aos 40 dias observou-se uma maior frequência dos gêneros *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., conforme apresentado na Tabela 13 e nos Anexos 6 e 7.

Observou-se que o número de fungos de maneira geral diminuiu muito quando comparou-se as condições de campo com as da casa de vegetação, ou seja, encontrou-se um número superior de isolados aos 20 dias. Algumas hipóteses poderiam ser levantadas: a temperatura extremamente elevada em condições de casa de vegetação aos 40 dias poderia ter prejudicado tanto o desenvolvimento das plantas, bem como o desenvolvimento dos fungos endofíticos; como outra possibilidade, talvez 40 dias seja um período insuficiente para que os fungos que são transmitidos via semente colonizassem todos os tecidos que crescem mais rápido não permitindo que os fungos colonizassem as plantas.

FIGURA 27 – PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DO MILHO DO CAMPO E DE CASA DE VEGETAÇÃO, CONSIDERANDO AS DIFERENTES IDADES DAS PLANTAS (20 DIAS E 40 DIAS).



Segundo RIESEN e CLOSE (1987), os fungos endofíticos em folhas de cereais parecem ter vida relativamente curta, o que confirma o fato de que aos 40 dias a maioria dos nove grupos de isolados diminuíram, principalmente em condições de casa de vegetação.

Trabalhos com gêneros isolados de *Nicotiana* spp. mostraram que o número e tipo de endófitos aumenta com a emergência, crescimento e desenvolvimento das folhas (SPURR e WELTY, 1975). RIESEN e CLOSE (1987) estudando fungos endofíticos em folhas de cevada tratadas e não tratadas com propiconazole, isolaram com maior frequência fungos dematiáceos como *Alternaria* spp. e *Cladosporium* spp, e outros fungos como *Stemphylium botryosum* Wallr., *Epicoccum purpurascens* Ehrenb: Schlecht. que foram isolados em menor porcentagem. Estes autores relataram que organismos como algumas leveduras e espécies de *Cladosporium*, bem adaptadas ao filoplano podem antagonizar outros fungos pela competição por nutrientes; já outras espécies como *Alternaria*, por exemplo, são mais hábeis em infectar folhas e tornar-se simbiossiontes neutros. Os fungos podem servir como fonte de inóculo (infecção latente) e tornar-se ativos novamente quando os tecidos ao redor são estressados ou mortos ou quando os órgãos das plantas tornam-se senescentes.

A explicação para justificar a ausência do gênero *Acremonium* aos 40 dias em casa de vegetação provavelmente se deva ao fato de que, nesta idade da planta, poderia

haver falta de nutrientes e condições ambientais insatisfatórias. Estes dados vão de encontro com os trabalhos de WHITE JR. e COLE (1986) que observaram a presença de *Acremonium* em gramíneas *Agrostis hiemalis* e *Poa rigidifolia* em preparações de tecidos dentro de colmos e bainhas de folhas de plantas maduras. Eles encontraram que algumas hifas de endofíticos podem ser incorporadas às folhas e continuam se desenvolvendo extensivamente no micélio intercelular presente em folhas maduras. Entretanto, algumas hifas podem ser deixadas no espaços entre folhas em diferenciação. No início do desenvolvimento estes espaços provavelmente contêm nutrientes e poderão suportar o crescimento do micélio; com a maturação das folhas o micélio superficial continua a se alongar na superfície da folha provavelmente em resposta à ausência de nutrientes, produz células conidiogênicas e conídios.

Em experimento conduzido com sementes de milho germinadas “in vitro” (item 3.6.1), foram isolados os gêneros *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Penicillium* sp., *Acremonium* sp., *Penicillium* sp. e fungos dematiáceos. Estes fungos foram isolados em folhas e colmos do milho em campo e casa de vegetação confirmando, assim, a transmissão destes fungos endofíticos em gramíneas a partir de sementes. Estes dados concordam com os de WHITE JR e COLE (1985) E CARROLL (1988) que relataram que em gramíneas os endófitos, no caso da associação *Acremonium* sp. e *Festuca* sp. formam infecção sistêmica e são transmitidos de uma geração para outra por meio de sementes do hospedeiro, não necessitando esporular (CLAY,1988).

Em relação a fungos endofíticos entomopatogênicos do milho, a melhor idade da planta para o isolamento do gênero *Beauveria* sp. foi aos 40 dias no campo e em casa de vegetação aos 20 dias. O gênero *Paecilomyces* sp. foi isolado no campo tanto aos 20 dias como aos 40 dias.

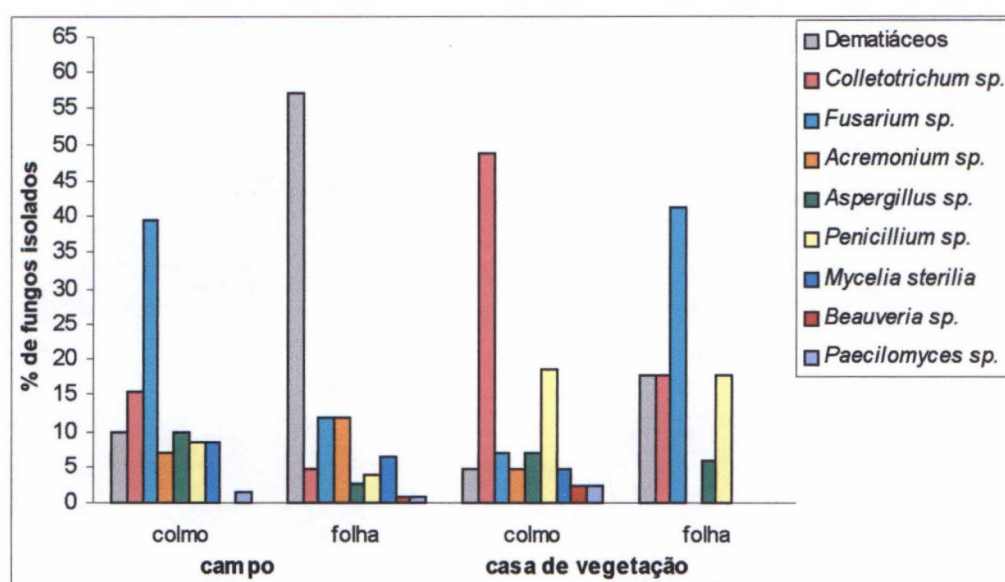
Em relação à interação gêneros e temperaturas, verificou-se que 28°C foi melhor para o desenvolvimento de todos os gêneros encontrados (Anexos 8 e 9). Em relação aos gêneros endofíticos entomopatogênicos pode-se constatar que o fungo *Beauveria* sp. em condições de campo se desenvolveu em temperatura de 37°C e em casa de vegetação a 28°C; já o gênero *Paecilomyces* sp. em condições de campo cresceu tanto a 28°C como a 37°C, porém, em casa de vegetação se desenvolveu

somente a 37°C, assim, a melhor temperatura para estes fungos seria a 37°C pois haveria a inibição de fungos de crescimento rápido. O mesmo não foi verdadeiro para os meios de cultivo utilizados, ou seja, eles não se mostraram discriminantes.

Com relação à interação gêneros e órgãos das plantas, analisando-se os dados do campo no colmo do milho observou-se uma maior frequência de infecção pelos gêneros *Fusarium sp.* e *Colletotrichum sp.*; já em relação às folhas foi observada uma maior frequência de infecção com fungos dematiáceos e pelo gênero *Fusarium sp.* (Anexos 10 e 11 e Figura 28).

Considerando colmo e folha do milho em casa de vegetação, nos colmos foi encontrada uma maior frequência dos gêneros *Colletotrichum sp.* e *Penicillium sp.*, enquanto que nas folhas encontrou-se uma maior frequência do gênero *Fusarium sp.*, seguido de *Colletotrichum sp.* e dos fungos dematiáceos em igual frequência (Figura 28).

FIGURA 28 - PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE MILHO DO CAMPO E DA CASA DE VEGETAÇÃO NOS DIFERENTES ÓRGÃOS DA PLANTA (COLMO E FOLHA).



Em campo o número de fungos dematiáceos isolados das folhas (entre eles o gênero *Alternaria sp.*) foi superior, o que concorda com os resultados encontrados por FISHER, PETRINI e LAPPIN SCOTT (1992), que relataram que a ocorrência deste gênero de crescimento rápido pode mascarar a presença de outros fungos de

crescimento lento. Foi observada especificidade do tecido pelo endófito através do teste de Tukey, reunindo em particular alguns fungos como *Fusarium* sp. no colmo e fungos dematiáceos nas folhas (Anexos 6 e 7).

Fungos dematiáceos mostram especificidade ao órgão do hospedeiro no caso das folhas, provavelmente pelo fato de neste grupo encontrarem-se vários gêneros sabidamente endofíticos como *Curvularia*, *Alternaria* e *Drechslera* (BERTONI e CABRAL, 1988; PEREIRA et al., 1993 e SCHULZ et al., 1998). SPURR e WELTY (1975) encontraram esta especificidade também em *Nicotiana* spp. com fungos como *Alternaria* que foi o endófito mais freqüente, seguido de *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. e *Cladosporium* spp. Outros fungos isolados em *Nicotiana* spp. incluem espécies de *Chaetomium*, *Choanephora*, *Cytospora*, *Epicoccum*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Rhizopus*, *Stemphylium* e *Trichoderma*.

No milho, o endófito *Acremonium* foi encontrado em maior porcentagem nas folhas mais velhas ou seja, nas folhas da parte inferior das plantas em condições de campo. Estes dados estão de acordo com o trabalho de BREEN (1994) que estudou estes endófitos, fungos obrigatórios de sementes e que formam infecções não aparentes em folhas, caules e inflorescências das gramíneas *Lolium* e *Festuca*. BREEN observou que aproximadamente duas a três semanas depois da germinação da semente as hifas penetram no tecido da folha e do caule e que a concentração do micélio pode variar dentro da planta. Observou também que, durante o crescimento vegetativo a maior parte do micélio de *Acremonium lolii* em azevém perene reside na bainha da folha e que as folhas velhas têm uma maior concentração de micélio do que as folhas novas.

Trabalhos importantes como os de PETRINI e FISHER (1990), que estudaram a ocorrência de fungos endofíticos em galhos de *Salix fragilis* e *Quercus robur* constataram que estes são ubíquos, e que, com exceção de *Phomopsis*, todos os gêneros tem sido registrados em outros hospedeiros (PETRINI, 1986). Já os fungos isolados de *Quercus* parecem ser hospedeiros menos específicos e alguns gêneros como *Beauveria* cf. *alba* (Linder) Saccas foram isolados de *Salix fragilis* e *Quercus robur* sendo que *Fusarium lateritium*, *Alternaria* sp., *Chaetomium bostruchodes* Zopf, *Chaetomium cocliodes*, *Cladosporium tenuissimum* Cooke foram isolados em menor

freqüência.

Outro trabalho foi realizado por BERTONI e CABRAL (1988) que estudaram a distribuição de endófitos na filosfera de *Eucalyptus vimminalis* e encontraram fungos dematiáceos como *Alternaria* em folhas jovens e maduras, *Cladosporium* em folhas maduras e ausência em folhas jovens e pecíolos, e *Mycelia sterilia* em folhas jovens e maduras e ausência no pecíolo. Os autores sugerem que uma das possíveis entradas dos endófitos para o interior da folha deste hospedeiro seria, por exemplo através dos estômatos e por isto seriam mais infectadas.

Para o isolamento de fungos endofíticos entomopatogênicos do milho como o gênero *Beauveria* sp., observou-se que ele foi encontrado nas folhas, na parte inferior da planta, aos 20 e 40 dias, e também em casa de vegetação aos 20 dias, no colmo na parte superior da planta.

No campo o fungo endofítico entomopatogênico *Paecilomyces* sp. foi encontrado no milho aos 20 dias e permaneceu até a idade de 40 dias da planta, porém em casa de vegetação foi encontrado somente aos 20 dias; foi encontrado no campo no colmo na parte superior da planta e também na folha na parte superior da planta e em condições de casa de vegetação no colmo na parte superior da planta. Estes dados concordam com os estudos realizados por SCHULZ et al.(1998), que encontraram *Paecilomyces* sp. em folhas e colmos de cevada; este gênero também foi encontrado no xilema de espécies de *Alnus* por FISHER e PETRINI (1990).

Tanto o gênero *Paecilomyces* sp. como *Beauveria* sp. foram encontrados em folhas e colmos do milho e cresceram bem em temperaturas de 28°C como a 37°C, e não mostraram-se exigentes em relação ao meio de cultivo utilizado.

#### 4.5 Fungos endofíticos da soja (*Glycine max* (L.) Merril.)

Relativamente poucos estudos tem sido conduzidos sobre a micobiota em folhas, vagens e sementes de soja em relação a fungos endofíticos. Os dados relativos ao número e porcentagem de fungos endofíticos isolados da soja no campo foram apresentados na Tabela 14 e os dados relativos à casa de vegetação na Tabela 15.

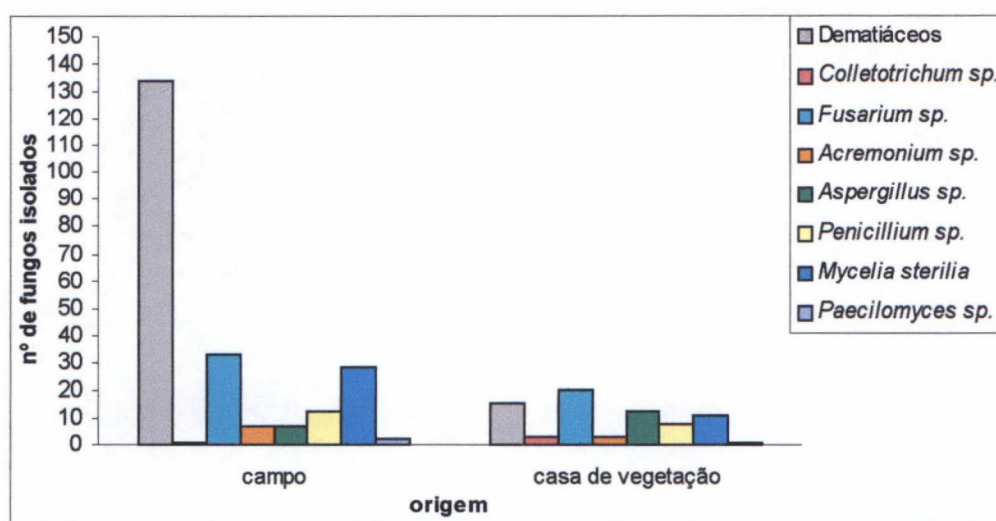
Na ANOVA (Anexo 12) encontrou-se significância a nível de pelo menos 5%

do fator gênero, o que significa que pelo menos um (1) entre os oito (8) é diferente dos demais, ou seja, assim como no milho, os oito grupos não foram isolados na mesma frequência, nem foram igualmente distribuídos nas diferentes condições de isolamento. As seguintes interações envolvendo os gêneros foram significativas: gêneros x origem; gêneros x idade das plantas; gêneros x temperaturas e gêneros x partes das plantas (Anexo12).

Assim, para facilitar a discussão, os dados de campo e casa de vegetação foram apresentados separadamente nas Tabelas 14 e 15, assim como nos Anexos 13 a 20.

No campo (Tabela 14) os grupos encontrados em maior frequência foram os dematiáceos e *Fusarium* sp., e pelo Teste de Tukey foi observada diferença significativa entre as médias (Anexo 13). Já na casa de vegetação, o gênero *Fusarium* sp. foi isolado em maior frequência seguido por dematiáceos e *Aspergillus* sp. Comparando-se com os dados do milho, observou-se que novamente os dematiáceos e *Fusarium* sp. encontraram-se em maior frequência respectivamente em condições de campo e casa de vegetação (Figura 29).

FIGURA 29 – NÚMERO DE FUNGOS ENDÓFITOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA NO CAMPO E EM CASA DE VEGETAÇÃO.



Em relação à interação gêneros e origens, no campo os fungos dematiáceos

foram isolados em maior frequência, já em casa de vegetação *Fusarium* sp. foi isolado em maior frequência, porém não foi observada, pelo Teste de Tukey, diferença entre eles (Anexos 13 e 14). Os dados encontrados estão de acordo com os trabalhos de MILLER e ROY (1982), que estudando a micobiota de folhas, vagens e sementes de soja, isolaram alguns fungos dematiáceos como *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Cladosporium herbarum* Link ex Gray, e outros gêneros como *Aspergillus* spp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium moniliforme* Sheld, *F. acuminatum* Ell e Ev., *F. equiseti* (Cda.) Sacc., *F. semitectum* Berk e Rav., *F. Trinctum* (Cda.) Sacc., *Paecilomyces* sp. e *Penicillium* spp.

Neste trabalho foi realizado um experimento com germinação de sementes de soja "in vitro" (item 3.6.1) e não foram encontrados fungos nestas sementes, assim provavelmente as plantas tornaram-se infectadas pela produção de esporos produzidos em restos de cultura durante toda a estação de crescimento. Os dados deste experimento não concordam com os dados de SINCLAIR (1991) que observou que sementes de soja infectadas ou não infectadas transmitem patógenos e outros microrganismos. Os termos infectados ou internamente na semente e infestadas ou externamente na semente referem-se a localização dos microrganismos na semente. As sementes de soja infectadas com a maioria dos microrganismos aparecerão sem sintomas, exceto quando um microrganismo crescer extensivamente sobre a superfície da semente, a exemplo de *Peronospora manshurica* (Naumov) Syd. In Gäum em sementes de soja. Geralmente a extensão da colonização em sementes de soja pela maioria dos patógenos é excepcional. Bioensaios com sementes esterilizadas de soja foram realizados e alguns fungos foram encontrados como: *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cercospora*, *Chaetomium*, *Choanephora*, *Cladosporium*, *Diploidia*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pestalotia*, *Pythium*, *Rhizopus*, *Sclerotinia* e *Thielavia*, porém poucos desses fungos induziram sintomas.

No Brasil, com exceção das gramíneas e erva-mate (PENNA, 2000) a maioria das plantas investigadas até o momento não possui sementes infectadas por microrganismos endofíticos.

TABELA 14 - NÚMERO E PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO TOTAL DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA DO CAMPO CONSIDERANDO DIFERENTES IDADES, TEMPERATURAS, ÓRGÃOS DAS PLANTAS, PARTES DAS PLANTAS E MEIOS DE CULTURA.

CAMPO	Dematiáceos		<i>Colletotrichum</i> sp.		<i>Fusarium</i> sp.		<i>Acremonium</i> sp.		<i>Aspergillus</i> sp.		<i>Penicillium</i> sp.		<i>Mycelia sterilia</i>		<i>Paecilomyces</i> sp.		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
20 dias	84	62,22	0	0,00	25	18,52	5	3,70	1	0,74	1	0,74	17	12,60	2	1,48	135	60,27
40 dias	50	56,18	1	1,12	8	8,99	2	2,25	6	6,74	11	12,36	11	12,36	0	0,00	89	39,73
28°C	127	65,47	1	0,51	28	14,43	3	1,55	4	2,06	10	5,15	19	9,80	2	1,03	194	86,60
37°C	7	23,33	0	0,00	5	16,67	4	13,33	3	10,00	2	6,67	9	30,00	0	0,00	30	13,39
Haste	63	59,43	0	0,00	17	16,04	5	4,72	3	2,83	6	5,66	12	11,32	0	0,00	106	47,32
Folha	71	60,17	1	0,85	16	13,56	2	1,70	4	3,38	6	5,08	16	13,56	2	1,70	118	52,68
HPIP*	37	56,06	0	0,00	16	24,24	4	6,06	1	1,52	1	1,51	7	10,60	0	0,00	66	29,46
HPSI**	26	65,00	0	0,00	1	2,50	1	2,50	2	5,00	5	12,50	5	12,50	0	0,00	40	17,86
FPIP***	48	64,00	0	0,00	10	13,33	2	2,67	2	2,67	1	1,33	11	14,67	1	1,33	75	33,48
FPSP****	23	53,50	1	2,32	6	13,95	0	0,00	2	4,65	5	11,63	5	11,63	1	2,32	43	19,19
AA	39	48,15	0	0,00	15	18,52	4	4,94	2	2,47	10	12,34	11	13,58	0	0,00	81	36,16
BDA	51	62,20	0	0,00	13	15,85	3	3,66	1	1,22	1	1,22	11	13,41	2	2,44	82	36,61
AFA	44	72,13	1	1,64	5	8,20	0	0,00	4	6,56	1	1,64	6	9,83	0	0,00	61	27,23
	134		1		33		7		7		12		28		2		224	

HPIP\* - haste da parte inferior da planta  
HPSI\*\* - haste da parte superior da planta

FPIP\*\*\* - folha da parte inferior da planta  
FPSP\*\*\*\* - folha da parte superior da planta

TABELA 15 - NÚMERO E PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO TOTAL DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA DA CASA DE VEGETAÇÃO CONSIDERANDO DIFERENTES IDADES, TEMPERATURAS, ÓRGÃOS DAS PLANTAS, PARTES DAS PLANTAS E MEIOS DE CULTURA.

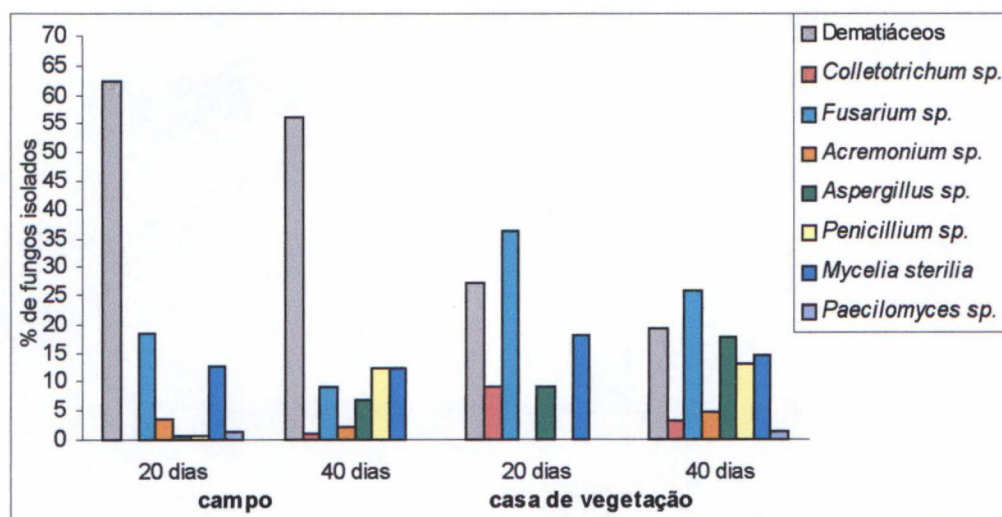
C.V.	Dematiáceos		<i>Colletotrichum</i> sp.		<i>Fusarium</i> sp.		<i>Acremonium</i> sp.		<i>Aspergillus</i> sp.		<i>Penicillium</i> sp.		<i>Mycelia sterilia</i>		<i>Paecilomyces</i> sp.		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
20 dias	3	27,27	1	9,10	4	36,36	0	0,00	1	9,09	0	0,00	2	18,18	0	0,00	11	15,07
40 dias	12	19,35	2	3,23	16	25,81	3	4,84	11	17,74	8	12,90	9	14,52	1	1,61	62	84,93
28°C	9	21,95	2	4,88	14	34,15	0	0,00	7	17,07	5	12,19	4	9,76	0	0,00	41	56,16
37°C	6	18,75	1	3,12	6	18,75	3	9,37	5	15,63	3	9,37	7	21,88	1	3,12	32	43,84
Haste	11	26,19	1	2,38	13	30,95	3	7,14	5	11,91	5	11,91	4	9,52	0	0,00	42	57,53
Folha	4	12,90	2	6,45	7	22,58	0	0,00	7	22,58	3	9,69	7	22,58	1	3,22	31	42,47
HPSP**	7	36,84	0	0,00	2	10,53	2	10,53	3	15,79	4	21,05	1	5,26	0	0,00	19	26,00
FPIP***	2	12,50	0	0,00	4	25,00	0	0,00	3	18,75	2	12,50	5	31,25	0	0,00	16	21,92
FPSP****	2	13,33	2	13,33	3	20,00	0	0,00	4	26,67	1	6,67	2	13,33	1	6,67	15	20,55
ΛΛ	6	21,43	1	3,57	7	25,00	1	3,57	3	10,71	3	10,71	7	25,00	0	0,00	28	38,36
BDA	5	15,15	2	6,06	10	30,30	1	3,03	6	18,18	4	12,12	4	12,12	1	3,03	33	45,20
ΛFΛ	4	33,33	0	0,00	3	25,00	1	8,33	3	25,00	1	8,33	0	0,00	0	0,00	12	16,44
	15		3		20		3		12		8		11		1		73	

HPSP\*\* - haste da parte superior da planta  
 HPSP\*\* - haste da parte superior da planta

FPSP\*\*\*\* - folha da parte superior da planta  
 FPIP\*\*\* - folha da parte inferior da planta

Considerando a interação gêneros e idade das plantas, com relação aos dados de campo (Anexo 13) foi observada uma maior freqüência de colonização de fungos dematiáceos e do gênero *Fusarium* sp. aos 20 dias. Aos 40 dias foram encontrados novamente os fungos dematiáceos e o gênero *Penicillium* sp e *Mycelia sterilia*. Em casa de vegetação aos 20 dias foi encontrado em maior freqüência o gênero *Fusarium* sp. e os fungos dematiáceos e aos 40 dias foram encontrados o gênero *Fusarium* sp. e os fungos dematiáceos (Anexos 15 e 16 e Figura 30). Segundo MILLER e ROY (1982) a incidência de fungos endofíticos em soja está geralmente relacionada com o estágio de desenvolvimento do órgão da planta dos quais eles são isolados.

FIGURA 30 PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA DO CAMPO E DA CASA DE VEGETAÇÃO EM DIFERENTES IDADES AOS 20 DIAS E AOS 40 DIAS .



O gênero *Colletotrichum* que foi isolado aos 40 dias no campo e aos 20 e 40 dias em casa de vegetação é conhecido por causar antracnose na soja, é endofítico e assintomático e pode estabelecer infecção latente em muitos outros hospedeiros. As plantas de soja são susceptíveis a *Colletotrichum* em todos os estágios de desenvolvimento, mas os sintomas típicos aparecem no início do estágio reprodutivo (estágio de crescimento R1-R2). Os sintomas severos desenvolvem-se após períodos prolongados de alta umidade, senescência da planta ou quando estas tornam-se estressadas. A fonte primária de inóculo consiste de semente infectada, restos culturais infectados e hospedeiros alternativos infectados (SINCLAIR e BACKMAN,1989). A

infecção latente também pode ser detectada em folhas de campo de soja e em restos culturais frescos cortados e mergulhados em paraquat, mas não em tecidos não tratados (HARTMAN; MANANDHAR e SINCLAIR, 1986; CERKAUKAS, 1988; SINCLAIR, 1991).

Em relação à interação origem e temperatura, todos os gêneros endofíticos da soja foram melhor isolados a 28°C com exceção do fungo *Mycelia sterilia* (Anexos 19 e 20).

Em relação aos fungos endofíticos entomopatogênicos isolados da soja, encontrou-se somente o gênero *Paecilomyces* sp. em condições de campo aos 20 dias e em casa de vegetação aos 40 dias. Foi isolado de material originado do campo a 28°C e em casa de vegetação a 37°C, em meio de BDA.

Levando-se em conta a interação gêneros e partes da planta, observou-se que no campo, para as diferentes partes da haste da soja houve uma maior frequência dos fungos dematiáceos seguido do gênero *Fusarium* sp. na haste da parte inferior da planta (Figura 31 e Anexo 19), na haste da parte superior da planta foram encontrados em maior frequência os fungos dematiáceos e os gêneros *Penicillium* sp. que diferiram entre si em relação as médias (Anexo 20). Não houve desenvolvimento do gênero *Colletotrichum* sp. e *Paecilomyces* sp. nas hastes da soja.

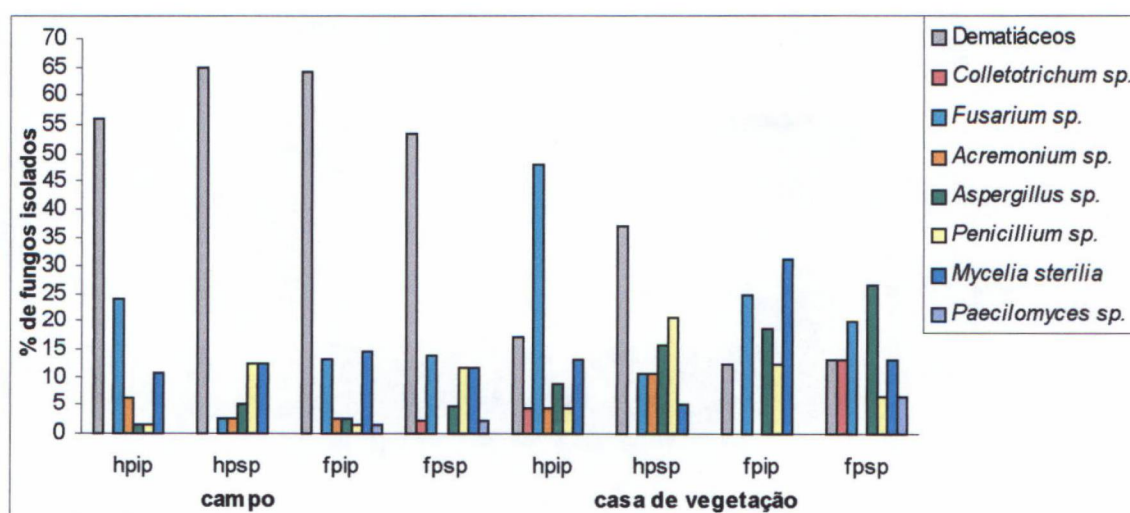
Ainda no campo, nas folhas da parte inferior da planta pode-se observar uma maior frequência de fungos dematiáceos e dos gêneros *Mycelia sterilia* e *Fusarium* sp. A presença do gênero *Acremonium* sp. só foi observado nas folhas da parte inferior da planta. Nas folhas da parte superior da planta foram isolados os fungos dematiáceos, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Mycelia sterilia* em igual porcentagem. O gênero *Colletotrichum* sp. foi isolado somente das folhas da parte superior da planta.

Nos dados de casa de vegetação observou-se nas hastes da parte inferior da planta uma maior frequência dos fungos do gênero *Fusarium* sp. e dos fungos dematiáceos. Nas hastes da parte superior da planta os fungos encontrados em maior frequência foram novamente os dematiáceos e o gênero *Penicillium* sp. Para as partes da planta em casa de vegetação observamos uma maior frequência de isolamento dos gêneros *Mycelia sterilia* e *Fusarium* sp. nas folhas da parte inferior da planta. Nas

folhas da parte superior da planta uma porcentagem maior para os gêneros *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp.. O gênero entomopatogênico *Paecilomyces* sp. foi isolado do campo nas folhas da parte inferior e superior da planta em condições de campo, já em casa de vegetação somente nas folhas da parte superior da planta (Figura 31). Segundo MILLER e ROY (1982), a maioria dos fungos predominantes e os fungos patogênicos ou considerados potencialmente patogênicos para a soja aumentam em frequência conforme a idade do órgão da planta. Por exemplo, *Alternaria alternata*, *Phoma* spp, *Colletotrichum dematium* var *truncata* e *G. cingulata* aumentaram nas folhas, *Diaphorte phaseolorum* var. *sojae* e *Fusarium* spp. aumentaram nas vagens e sementes e *Cercospora kikuchii* aumentou nas vagens; entretanto, a frequência de *Diaphorte phaseolorum* var. *sojae* e *Alternaria alternata* diminuiu em folhas e sementes, respectivamente.

Estes mesmos autores observaram que a frequência com a qual os fungos ocorreram em um dado órgão da soja varia anualmente e a frequência de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum dematium* var. *truncata* em folhas exemplificou esta variação. Baseado na porcentagem geral dos isolados, as folhas foram colonizadas por fungos em maior extensão do que as vagens e estas mais que do que as sementes (folhas 53%, vagens 35% e sementes 12%).

FIGURA 31 – PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DE SOJA DO CAMPO E DA CASA DE VEGETAÇÃO NAS HASTES E FOLHAS NA PARTE INFERIOR E SUPERIOR DA PLANTA (hpip = haste da parte inferior da planta, hpsp = haste da parte superior da planta, fpip = folha da parte inferior da planta, fpsp = folha da parte superior da planta).



SINCLAIR (1991) relatou que a infecção latente em soja resulta de um processo de coevolução entre cultura e patógeno que permite acumulação de muita resistência e aptidão genética entre o hospedeiro e vários parasitas. Plantas altamente suscetíveis e patógenos altamente virulentos são eliminados primeiramente no processo evolutivo. O mecanismo envolvido na infecção latente, a herança de cada mecanismo, e a influência do ambiente na expressão deste mecanismo podem ser importantes no desenvolvimento de cultivares tolerantes.

Infecção latente tem sido relatada como uma raça não específica ou tipo de resistência horizontal, porque tal resistência é efetiva para alguns graus contra a maioria, ou todas as raças do patógeno envolvido. O grau e o tipo de resistência estão relacionados com o período de tempo de latência, sendo que a habilidade em infectar a soja sem sintoma é importante para a sobrevivência deste fungo (CERKAUKAS e SINCLAIR, 1980).

#### 4.6 Fungos endofíticos entomopatogênicos do milho (*Zea mays* L.) e da soja *Glycine max* (L.) Merrill).

O gênero endofítico entomopatogênico *Beauveria* sp. foi isolado de plantas de milho aos 40 dias, em condições de campo somente nas folhas da parte inferior da planta e aos 20 dias em casa de vegetação somente no colmo na parte superior da planta. Este fungo é bastante conhecido e largamente empregado no controle biológico de insetos pragas da agricultura, e foi encontrado como endófito no milho protegendo o hospedeiro contra o ataque de insetos (BING e LEWIS, 1993). A relação endofítica entre fungos entomopatogênicos em plantas de milho é única comparada com outras relações plantas/fungos. Estes autores encontraram que o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* pode colonizar a planta do milho no estágio vegetativo quando a planta emite o último verticilo e que move-se dentro da planta e persiste por longo tempo; relataram ainda que o movimento dentro da planta é possivelmente passivo dentro do sistema vascular.

BING e LEWIS (1992a) demonstraram que *Beauveria bassiana* quando

aplicado nas folhas no estágio vegetativo, quando a planta emite o último verticilo, protege a cultura de larvas de *Ostrinia nubilalis*, porém o fungo pode não persistir e não suprimir as larvas. Quando injetado dentro da planta *Beauveria bassiana* deslocou-se primeiramente com fotossintatos no tecido vascular das plantas e reduziu significativamente o ataque de *Ostrinia nubilalis*, porém a colonização do milho foi independente da infestação da praga (BING E LEWIS, 1992 b). Outro aspecto importante é que trocas fisiológicas durante a maturação não exerceram um impacto negativo na virulência do fungo. As condições ambientais extremas (temperaturas e chuvas acima da média) no caso do experimento em questão podem ter contribuído para a diferença na virulência entre os anos em que foram realizados os experimentos.

Em relação ao fungo *Paecilomyces* sp., ele foi observado no campo aos 20 dias e 40 dias, no colmo e nas folhas na parte superior da planta do milho, e em casa de vegetação foi observado aos 20 dias no colmo na parte superior da planta, tendo sido isolado também de soja do campo aos 20 dias, nas folhas na parte superior da planta e aos 40 dias da casa de vegetação somente nas folhas da parte superior da planta. Estes dados concordam com estudos realizados por SCHULZ et al.(1998), que encontraram o gênero *Paecilomyces* sp. em folhas e caules de cevada, e também no xilema de espécies de *Alnus* por FISHER e PETRINI (1990).

Outros fungos dematiáceos, como *Cladosporium* que foi isolado em condições de campo e casa de vegetação em milho e soja, é considerado como epifítico (RODRIGUES e PETRINI, 1997) e entomopatígeno por ROBBS e BITTENCOURT (1998). Estes dados estão de acordo com informações de RODRIGUES e PETRINI (1997), os quais afirmam que epifíticos normalmente encontrados nas folhas como *Aureobasidium pullulans*, *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. e *Epicoccum purpurascens* podem tornar-se endofíticos em folhas jovens e sadias para se protegerem da desidratação e da irradiação.

Ainda entre os fungos entomopatogênicos, o gênero *Fusarium* sp. foi isolado tanto na soja como no milho, em condições de campo e casa de vegetação, e segundo ALVES (1998) ele pode ocorrer sobre insetos e se comportar como um patógeno fraco (pouco virulento), exceto aquele que ocorre em coccídeos como *F. lateritium* que é

capaz de produzir toxinas semelhantes à beauvericina. No Brasil, em pomares de pêsego e citros diversas espécies do gênero *Fusarium* ocorrem com grande intensidade sobre coccídeos, sendo a espécie de *F. coccophilum* de ocorrência comum em *Parlatoria cinerea* nos pomares de citros de São Paulo.

Apesar do gênero *Beauveria* ser considerado um dos mais importantes no controle de pragas agrícolas, outro gênero como *Aspergillus* sp. que foi isolado em soja e milho nas diferentes condições estudadas como citado anteriormente, foi encontrado também por GARCIA e HABIB (1978) sobre insetos na fase assexual. Comumente ele é considerado como um agente secundário no processo-doença, sendo sua ocorrência comum sobre insetos moribundos já colonizados por outros patógenos ou submetidos a diferentes tipos de estresse em condições de laboratório e campo. A contaminação via oral é a mais comum e o inseto pode morrer antes da pupação, porém, em experimento de inoculação de *Aspergillus parasiticus* por via oral em lagartas de *Spodoptera frugiperda* obteve-se a mortalidade de adultos.

O fungo do gênero *Aspergillus* é conhecido também por produzir metabólitos secundários, ativos sobre diversos organismos vivos, provocando inibição de crescimento, doenças e posteriormente sua morte. Dentre esses metabólitos, destacamos as aflatoxinas produzidas por linhagens de *Aspergillus flavus* (DIENER e DAVIS, 1969) a ochratoxina de *Aspergillus ochraceus* (KODAIRA, 1961; MYOKEY et al., 1969).

O endófito *Acremonium* sp. isolado de soja e milho em condições de campo e casa de vegetação, também foi estudado por BREEN (1993 a;1993 b) em várias espécies de gramíneas, como festucas e em *L. perenne* com relação ao ataque de três espécies de afídios, e também com duas espécies de lepidópteros, a *S. frugiperda* e *S. eridania*. Na maioria dos ensaios foi constatada uma diminuição na sobrevivência dos insetos, porém cada caso foi considerado diferente do outro, sugerindo que o genótipo da planta, o endófito e os insetos têm que ser analisados um a um, pois, dependendo das condições, pode ou não haver controle e podem também ocorrer efeitos contrários como o aumento da incidência da praga na presença do endófito.

## 5. CONCLUSÕES

- Constatou-se a presença de fungos endofíticos nos dois hospedeiros tropicais ensaiados, milho (*Zea mays* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill), e de endófitos entomopatógenos, com possível papel no controle de pragas agrícolas.
- Da análise quantitativa do número de fungos endofíticos isolados do milho e da soja observou-se que houve diferença significativa a 1% quanto a origem; a frequência de fungos isolados no campo foi maior do que em casa de vegetação.
- Microrganismos endofíticos atuam no controle de pragas podendo potencialmente reduzir o uso de agroquímicos.
- As sementes de milho germinadas “in vitro” apresentaram os mesmos gêneros de fungos endofíticos encontrados em plantas de campo e casa de vegetação, o que indica que a potencial existência de fungos de valor biotecnológico é mantida por transferência via sementes, já na soja isto não ocorre, o que significa que inoculantes no mesmo sistema usado na fixação de nitrogênio poderão ser usados para fungos endofíticos na cultura da soja.
- Como perspectivas futuras: a) testar a potencialidade dos gêneros endofíticos entomopatógenos *Beauveria* sp. e *Paecilomyces* sp. através de bioensaios para comprovação da virulência dos mesmos; b) desenvolvimento de um bioinseticida visando a possível produção de uma formulação eficiente e estável para o uso em larga escala em condições de campo; c) identificação dos genes que possam estar envolvidos na produção de metabólitos tóxicos produzidos por fungos endofíticos entomopatogênicos contra insetos praga e posterior manipulação para produzir organismos mais virulentos e a inserção destes genes em linhagens pouco ativas.

## REFERÊNCIAS

AGOSTINI, J. P.; TIMMER, L. W.; MITCHELL, D. J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum* sp. *gloeosporioides* from *Citrus*. **Phytopathology**, v. 82, p. 1377-11382, 1992.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 3 ed. New York. Academic Press, 1988. 803p.

AHMAD, S.; GOVINDARAJAN, S.; FUNK, C. R.; JOHNSON-CICALESE, J. M. Fatality of house crickets on perennial ryegrass infected with a fungal enddophyte. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.39, p. 183-190, 1985.

AHMAD, S.; JOHNSON-CICALESE, J. M.; DICKSON, W. K.; FUNK, C. R. Endophyte-enhanced resistance in perennial ryegrass to the bluegrass billbug *Sphenophorus parvulus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 41, p. 3-10, 1986.

AHMAD, S.; GOVINDARAJAN, S.; JOHNSON-CICALESE, J.; M FUNK, C. R. Association of a fungal endophyte in perennial ryegrass to larvae of the southern armyworm, *Spodoptera eridania*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.43, p. 287-294, 1987.

ALLEN, G. E.; GREGORY, B. G. ; BRAZZELL, J. R. Integration of the *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus into a biological control program on cotton. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 59, p.1333-1336,1996.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo: Brazil, 1998. 1163p.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA AGRICULTURA BRASILEIRA (AGRIANUAL),

São Paulo, 2000.

ARECHAVALETA, M.; BACON, C. W.; HOVELAND, C. S.; RADCLIFE, D. E. Effects of tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. **Agronomy Journal**, v. 81, p. 83-90, 1989.

ARX, J. A. VON. **The Genera of fungi sporulation in pure culture**. 2 ed. Vaduz: J. Cramer, 1974. 351p.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L., ed. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. p. 117-137.

AZEVEDO, J. L.; MACHERONI JR., W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 01-36, 2000.

BACON, C. W. Procedure for isolating the endophyte from tall fescue and screening isolates from ergot alkaloids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2615-2618, 1988.

BACON, C. W.; HILLS, N. S. Symptomless grass endophytes: products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptation of grasses. In: **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. REDLIN, S. C. ; CARRIS, L. M. (eds) American Phytopathological Society Press, St. Paul., p. 155-178, 1996.

BACON, C. W.; PORTER, J. K.; ROBBINS, J. D. ; LUTTRELL, E. L. *Epicchloë typhina* from toxic tall fescue pastures. **Applied Environmental Microbiology**, n. 34, p. 576-581, 1977.

BALL, O. J. P.; BARKER, G. M.; PRESTIDGE, R. A.; LAUREN, D. R. Distribution

and accumulation of the alkaloid peramine in *Neotyphodium lolii*-infected perennial ryegrass. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, p. 1419-1434, 1997 a.

BALL, O. J. P.; MILES, C. O.; PRESTIDGE, R. A ergopeptide alkaloids and *Neotyphodium lolii*-mediated resistance in perennial ryegrass against adult *Heteronynchus arator* (Coleoptera Sacarabaeidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 90. p. 1382-1391, 1997b.

BARKER, G. M.; POTTINGER, R. P.; ADDISON, P. J. ; PRETDGE, R. A Effect of *Lolium* endophyte fungus infection on behavior of adult Argentine stem weevil. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 27, p. 271-277, 1984.

BARNETT, H. C.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3 ed. Mineapolis, Burgess Publ.,1972. 241p.

BARROS, N. M.; ROSSATO, M.; ONOFRE, S. B. *Nomureaea rileyi* como agente de controle microbiano da lagarta-da-soja. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. ed. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio ambiente, 2000. p. 231-249.

BERSTEIN, M. E.; CARROLL, G. C. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage **Canadian Journal of Botany**, v.55, p. 644-653, 1977.

BERTONI, M. D.; CABRAL, D. Phyllosphere of *Eucalyptus viminalis* II: Distribution of endophytes. **Nova Hedwigia**, v.46, p. 491-502, 1988.

BILLS, G. F.; GAICOBBE, R. A.; LEE, S. H.; PELÁEZ, F.; KACZ, J. S. Tremorgenic mycotoxins paspalitrem A and C , from a tropical *Phomopsis*. **Mycological Research**, v. 96, p. 977-983, 1992.

BILLS, G.F.; REDLIN, S. C.; CARIS, L .M. **Isolation and analysis of endophytic**

**fungal communities from woody plants.** 1996. p. 31-65.

BILLS, G. F.; POLISHOOK, J. D. Microfungi from *Carpinus caroliniana*. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 1477-1482, 1991.

BING, L. A.; LEWIS, L. C. Supression of *Ostrinia nubilalis* (Hübner)(Lepidoptera : Pyralidae) by Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo)Vuillemin. **Envinonmental Entomology**, v.20, p 1207-1211, 1991.

BING, L. A.; LEWIS, L. C. Temporal relationships between *Zea mays*, *Ostrinia nubilalis* (Lep.; Pyralidae) ans endophytic *Beauveria bassiana*. **Entomophaga**, v. 37, p. 525-536, 1992 a.

BING, L. A.; LEWIS, L. C. Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn : the influence of plant growth satage and *Ostrinia nubilalis*(Hübner). **Biocontrol Science and Technology**, v. 2, p. 39-47, 1992b.

BING, L. A.; LEWIS, L. C. Occurrence of entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. and virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hübner). **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 45, p. 147-156, 1993.

BIONDI, S.; THORPE, T. A. Requeriments for a tissue culture facility. In: THORPE, T. A. ed. **Plant tissue culture-methods and applications in agriculture**. New York. Academic Press, p. 1-20, 1981.

BLANCO, C. G. *Guignardia citricarpa* Kiely: análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro. Tese, 1999. 200 p. - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

BREEN, J. Temperature and seasonal effects on expression of *Acremonium* endophyte-enhanced resistance to *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae) **Environmental Entomology**, v. 21, p. 68-74, 1992.

BREEN, J. P. Enhance resistance to fall armyworm (Lepidoptera:Noctuidae) in *Acremonium* endophyte-infected turfgrasses. **Journal of Economic Entomology**, v. 86, p. 621-629, 1993 a

BREEN, J. P. Enhanced resistance to three species of aphids (Homoptera: Aphididae) in *Acremonium* endophyte-infected turfgrasses. **Journal of Economic Entomology**, v. 86, p. 1279-1286, 1993b.

BREEN, J. P. *Acremonium* endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. **Annual Review of Entomology**, v.39, p. 401-423, 1994.

BULTMAN, T. L.; GANEY, D. T. Induced resistance to fall armyworm ( Lepidoptera-Noctuidae ) mediated by a fungal endophyte. **Environmental Entomology**, v. 24, p. 1196-1200, 1995.

BULTMAN, T. L.; CONRAD, N. J. Effects of endophytic fungus, nutrient level and plant damage on performance of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, v. 27, p. 631-635 ,1998.

BURGES, H. D.; CROZIER, G.; HEBER, J. A review of safety tests on Baculoviruses. **Entomophaga**, v. 25, p.329-340, 1980.

CABRAL, D. Phyllosphere fo *Eucalyptus viminalis*. Dynamics of fungal populations. **Transactoins of the British Mycological. Society**, v. 85, p. 501-511, 1985.

CALHOUN, L. A.; FINDLAY, J. A.; MILLER, J .D.; WHITNEY, N. J. Metabolites

toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes. **Mycological Research**, , v.96, p .281-6, 1992.

CANAVESI, F. Beziehungen zwischen Endophytischen Pilzen von *Abies alba* Mill und den Pilzen der Nadelstreue. Dissertation. EHT no.8325, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich, Switzerland, 1987.

CARROLL, G. C. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA. N.J.; HEUVEL,J. VAN DEN (ed) **Microbiology of phyllosphere**, London: Cambridge University Press, 1986. p. 205-22.

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

CARROLL, G. Forest endophytes: pattern and process. **Canadian Journal of Botany**, v. 73 (supl 1), p. 1313-1324, 1995.

CARROLL, G. C.; CARROLL, F. Studies on the incidence of coniferous endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, v. 5, p. 3034-43, 1978.

CARROLL, F. E.; MÜLLER, B. C.; SUTTON, B. C. Preliminary studies on the incidence of the needle endophytes in some European conifers. **Sydowia**, v. 29, p.87-103, 1977.

CARVALHO, R. P. L. Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith,1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho, em condições de campo. Piracicaba: ESALQ/USP,1970. Tese de Doutorado.

CERKAUSKAS, R. F. Latent colonization by *Colletotrichum* sp.: epidemiological considerations and implications for mycoherbicides. **Canadian Journal of Plant**

**Pathology**, v. 10, p. 297-310, 1988.

CERKAUSKAS, R. F.; SINCLAIR, J. B. Use of paraquat to aid detection of fungi in soybean tissues. **Phytopatology**, v. 70, p. 1036-1038, 1980.

CHANWAY, C. P. Endophytes: they're not just fungi! **Canadian Journal Botany**, v. 74, p. 321-322, 1996.

CHASE, A., R.; OSBORNE, L. S.; FERGUSON, V. M.. Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from a artificial potting medium. **Florida Entomologist** , v. 69, p. 285-292, 1986.

CHRISTENSEN, M. J.; LATCH, G. C. M.; TAPPER, B. A. Variation within isolates of *Acremonium* endophytes from perennial ryegrass. **Mycological Research**, v. 95, p. 918-923, 1991.

CIANCIO, A observations on the nematicidal properties of some mycotoxins. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 18, p. 451-454, 1996.

CLAY, K. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. **Oecologia**, Berlin, v.73, p. 358-362, 1987.

CLAY, K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. **Ecology**, Brooklyn, v.69, p. 10-16, 1988.

CLAY, K. Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potencial agents. **Mycological Research**, v. 92, p. 1-12, 1989.

CLAY, K. Interactions among fungal endophytes grasses and herbivores. *Researches on Population*. **Ecology**, v.38, p. 191-201., 1996.

CLAY, K. , HARDY, T. N.; HAMMOND JR, A M. Fungal endophytes of *Cyperus* and their effect on the insect herbivore. **American Journal of Botany**, v. 72, p. 1284-1289, 1985 a.

CLAY, K. , HARDY, T. N.; HAMMOND JR., A M. Fungal endophytes of grasses and their effects on an insect herbivore. **Oecologia**, v. 66, p. 1-6, 1985 b.

CLAY, K.; MARKS, S.; CHEPLICK, G. P. Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. **Ecology**, v.74, p. 1767-1777, 1993.

CLAYDON, N. GROVE, J. F.; POPLE, M. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. **Phytochemistry**, v. 24, p. 937-943, 1985.

CLARK, C. L.; MILLER, J. D.; WHITNEY, N. J. Toxicity of conifer needle endophytes to spruce budworm. **Mycological Research**, v.93, p. 508-512, 1989.

CLEMENT, S. L.; PIKE, K. S.; KAISER, W. J.; WILSON, A. D. Resistance of endophyte-infected plants of tall fescue and perennial ryegrass to the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphidae) **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 63, p. 646-648, 1990.

CLEMENT, S. L.; LESTER, D. G.; WILSON, A D.; PIKE, K. S. Behavior and performance of *Diuraphis noxia* (Homoptera:aphididae) on fungal endophyte-infected and uninfected perennial ryegrass. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 583-588, 1992.

CLEMENT, S. L.; WILSON, A D. ;LESTER ,D. G.; DAVITT, C. M. Fungal endophytes of wild barley and their effects in *Diuraphis noxia* population development. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.82, p. 275-281, 1997.

CRISAN, E. V. Mechanism responsible for release of toxin by *Metarhizium anisopliae* spores in mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 17, p. 260-264, 1971.

CRUZ, I. Impact of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Smith and Abott 1797) on grain yield in field corn . West Lafayette: Purdue University, 1980. 162 p. Tese de Mestrado.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas : EMBRAPA, CNPMS, 1995 a, 45 p. (EMBRAPA-CNPMS.Circular técnica, 21)

CRUZ, I. Manejo Integrado de pragas do com ênfase para o controle biológico In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS, 4., 1995 Campinas, SP. **Anais: Instituto Biológico**, 1995 b, p. 48-92.

CRUZ, I. Manejo de pragas da cultura do milho. In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO SAFRINHA, 5, 1999, Barretos, SP. **Cursos para agricultores**. Campinas: IAC, 1999. p. 27-56.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; VALICENTE, F. H.; OLIVEIRA, A C. Application rate trials with a nuclear polyhedrosis virus to control *Spodoptera frugiperda* (Smith) on maize. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina v.26, p. 145-152, 1997.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C; OLIVEIRA, A C.; VASCONCELOS, C. A. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management**. v. 44, 1999 a (no prelo).

CRUZ, I.; OLIVEIRA, J. L.; VASCONCELOS, C, A ;OLIVEIRA, A C. Efeito no

nível de saturação de alumínio em solo ácido sobre os danos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em milho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v. 25, p. 293-297, 1996.

CRUZ, I.; TURPIN, F. T. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estágios de crescimento da cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 355-359, 1982.

CRUZ, I.; TURPIN, F. T. yield impact of larval infestation of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) to mid-whorl growth stage of corn. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 76, n.5, p.1052-1054, 1983.

CRUZ, L. C. H. **Micologia Veterinária**. Itaguaí: UFRRJ, Imprensa Universitária, p. 202, 1981.

DAIGLE, C. J. ; BOETHEL, D. J.; FUXA, J.R. Parasitoids and pathogens of soybean looper and velvet caterpillar ( Lepidoptera: Noctuidae) in soybeans in Louisiana. **Environmental Entomology**, v. p. 746-752, 1990.

DAVIDSON, A.; POTTER, D. A. Response of plant-feeding predatory and soil-inhabiting invertebrates to *Acremonium* endophyte and nitrogen fertilization in tall fescue turf. **Journal of Economic Entomology**, v. 88, p. 367-379, 1995.

DE GASPARI, N. GOMEZ, S. A. Controle químico da lagarta da soja em condições de campo no Mato Grosso do Sul . **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, n.4, p.513-517, 1982.

DIENER, L. U. ; DAVIS, N. D. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. In: GOLDBLATT, L. A Aflatoxin. New York: Academic Press, 1969. Cap.2.

DORSHER, E.; LARDY, H. Specificity of ion transport induced by beauvericin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 19, p. 11-14, 1969.

DORWORTH, D. E.; CALLAN, B. E.; REDLIN, S. C.(ed); CARRIS, L, M. Manipulation of endophytic fungi to promote their utility as vegetation biocontrol agents. **American Phytopathological Society (APS Press)**; St Paul, Minenesota. 1996. p. 209-216.

EISENCHER, H.; DAHLMAN, D. L. Antibiotic and deterrent qualities of endophyte-infected tall fescue to two aphid species (Homoptera:Aphididae) **Environmental Entomology**, v.21, p. 1046-1051, 1992.

ELLIS, M. B. Dematiaceous hyphomycetes. Surrey, **Commonwealth Mycological Institut**, 1971. 507 p.

ELLIS, M. B. More dematiaceous hyphomycetes. Surrey, **Commonwealth Mycological Institut**, 1976. 507p.

EMBRAPA SOJA - Recomendações técnicas para a cultura da soja na região central do Brasil 200/01 Embrapa Soja- Londrina: Embrapa Soja/Fundação MT, 2000. 245p.

ESPINOSA-GARCIA, F. J.; LANGENHEIM, J. H. The endophytic fungal community in leaves of a coastal redwood population-diversity and spacial patterns. **New Phytologist**, Cambridge, v.116, p. 89-97, 1990.

FAETH, S. H.; HAMMON, K. E. Fungal endophytes and phytochemistry of oak foliage: Determinants of oviposition preference of leafminers? **Oecologia** , p. 728-736, 1996.

FAETH, S. H. ; HAMMON, K. E. Fungal endophytes in oak trees: long-term patterns

of abundance and associations with leafminers. **Ecology**, v. 78, p. 810-819, 1997a

FAETH, S. H.; HAMMON, K. E. Fungal endophytes in oak trees: Experimental analysis of interactions with leafminers. **Ecology**, v.78, p. 820-827, 1997b.

FAHEY, J. W. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. In: **Biologically active natural products**. Washington: American Chemical Society, 1988. Chapter, 9, p.120-128.

FEHRET, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PENNINGTON, J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merril. **Crop Science**, v.11, p. 929-930, 1971.

FINDLAY, J. A; BUTHELEZI, S.; LI, G. Q.; SEVECK. M.; MILLER, J. D. Insect toxins from na endophytic fungus from wintergreen, **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 1214-1215, 1997.

FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; PETRINI, O. Antibiotic activity of some endophytic fungi from ericaceous plants. **Botanica Helvetica**, Basel, v. 94, p. 249-253, 1984.

FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; PETRINI, O. Antibiotic activity of some endophytic fungi from *Ulex europacua* and *Ulex galli*. **Botanica Helvetica**, v. 96, p.37-41, 1986.

FISHER, P. J.; PETRINI, O. A comparative study of fungal endophytes in xylem and bark of *Alnus* species in England and Switzerland. **Mycological Research**, v.4, p. 313-319, 1990.

FISHER, P. J.; PETRINI, O.; LAPPIN SCOTT, H. M. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v.122, p. 299-305, 1992.

FISHER, P. J.; SUTTON, B. C.; PETRINI, L. E.; PETRINI, O. Fungal endophytes from *Opuntia stricta*: a first report . **Nova Hedwigia**, v. 59, p. 195-200, 1994.

FISHER, P. J.; PETRINI, L. E.; PETRINI, O.; SUTTON, B. C Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* from England, Majorca and Switzerland. **New Phytopathology**, v. 127, p. 133-137, 1994.

FOKKEMA, N. J. Fungal antagonisms in the phyllosphere. **Annual Applied Biology**, v. 89, p. 115-119, 1978.

FOKKEMA, N. J.; VAN DEN HEUVEL, J. ed. **Microbiology of the phylloplane**. Cambridge University Press, 1986.

FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R. J. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic , endophytic mutualist. **Science**, v. 260, p. 75-78, 1993.

FUNK, C. R. ; HALISKY, P. M. JOHNSON, M. C.; SIEGEL, M. R. ; STEWART, A V. AHMAD, S.; HURLEY, R. H. ; HARVEY, I. C. An endophytic fungus and resistance to sod webworms: association in *Lolium perenne*. **Bio/Technology**, v. 1, p. 189-191, 1983.

GAI, C. S.; AZEVEDO, J. L. ; ARAÚJO, W.; MACHERONI, JR. Colonização de limão cravo *Citrus limonia* por leveduras e fungos endofíticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador **Anais**. Salvador: SBM, 1999. p. 43.

GARCIA, M. A; M., E., M. HABIB. Ocorrência do fungo entomopatígeno *Asp.ergillus parasiticus* Speare em adulto de *Spodoptera frugiperda*, mantidos em laboratório. **Annual. Society. Entomology**, Brasil, v. 1 p. 14-19, 1978.

GASSEN, D. N. **Manejo de pragas associadas à cultura do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 134 p.1996.

GAYNOR, D. L. ; HUNT, W. F. The relationship between nitrogen supply, endophytic fungus and Argentine stem weevil resistance in ryegrass. **Proceedings of the New Zealand Grassland Association**, v. 44, p. 257-263, 1983.

GINDRAT, D.; PEZET, R. Paraquat, a tool for rapid detection of latent fungal infections and endophytic fungi. **Journal of Phytopathology**, v. 141, p. 86-98, 1994.

GLIENKE, C. Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD .Curitiba, 1995. 115p. Dissertação (M.S.) – Universidade Federal do Paraná.

GREGORY, B. M. JR. Observations on velvet caterpillar (Lepidoptera : Noctuidae) in hyacinth bean field in Honduras. **Florida Entomology**, v. 70, p. 296-297, 1987.

GROVE, J. F.; POPLE, M. The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. **Mycopathologia**, v.70, p. 103-105, 1980.

GUPTA, S.; KRASNOFF, S. B. ; NDERWOOD, N. L.; RENWICK, J. A A ; ROBERTS, D. W. Structures of the efraeptins: potent inhibitors of mitochondrial ATPase from the fungus *Tolyocladium niveum*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, p. 707-709, 1991.

HARDY, T. N.; CLAY, K.; HAMMOND, JR. A M. Fall armyworm (Lepidoptera:Noctuidae); A laboratory bioassay and larval preference study for the fungal endophyte of perennial ryegrass. **Journal of Economic Entomology**, v. 78, p. 571-575, 1985.

HARTMAN, G. L.; MANANDHAR, J. B.; SINCLAIR, J. B. Incidence of *Colletotrichum* spp. on soybean and weeds in Illinois and pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**, v.70, p. 780-782, 1986.

HERD, S.; CHRISTENSEN, M. J.; SAUNDERS, K.; SCOTT, D.B.; SCHMID, J. Quantitative assessment of *in planta* distribution of metabolic activity and gene expression of an endophytic fungus. **Microbiology**, v. 143, p. 267-275, 1997.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; FOERSTER, L. A.; NEWMAN, C. G. Incidência estacional de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em *Anticarsia gemmatilis* Hubner, 1818, e *Plusia* sp, relacionada com fatores climáticos. IN: **Seminário de Pesquisa de Soja**, 1. Londrina, 1978. Ansis. Londrina, EMBRAPA-CNPSO, v. 2, p. 11-15, 1979.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; NEWMAN, C. G.; FOERSTER, L. A. Incidência estacional de doenças e parasitas em populações naturais de *Anticarsia gemmatilis* Hubner, 1818, e *Plusia* spp, em soja. In: **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.8, n. 1, p. 115-124, 1979.

IGNOFFO, C. M.; CHAPMAN, A J.; MARTIN, D. F. The nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis zea* (Boddie) and *Heliothis virescens* (Fabricius) . III. Effectiveness of the virus against field populations of *Heliothis* on cotton, corn and grain sorghum. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.7, p. 227-235, 1965.

IGNOFFO, C. M. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide. In: BURGESS, H. D. ed. **Microbial control pests and plant diseases**. London: Academic Press, 1981. p. 513-538.

IGNOFFO, C. M.; BOUCIAS, D. B. Relative activity of geographical isolates of *Nomuraea* bioassayed against cabbage looper and velvet caterpillar. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 59, p. 215-217, 1992.

ISAAC, S. **Fungal-plant interactions**. London: Chapman e Hall, 1992. 418 p.

JOHNSON, J. A.; WHITNEY, N. J. A study of fungal endophytes of needle of balsam fir (*Abies balsamea*) and red spruce (*Picea rubens*) in New Brunswick, Canada, using culture and electron microscope techniques. **Canadian Journal of Botany**, v.67, p. 3513-3516, 1989.

JOHNSON, J. A. ;WHITNEY, N. J. Citotoxicity and inseticidal activity of endophytic fungi from black spruce (*Picea mariana*) needles. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 24-27, 1994.

JOHNSON, M. C.; DAHLMAN, L. D.; SIEGEL, .M.R.; BUSH, L.P.; LATCH, G. C. M.; POTTER, D. A; VARNEY, D. R. Insect feeding deterrents in endophyte-infected tall fescue. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, p. 568-571, 1985.

JU, Y.; SACALIS, J. N.; STILL, C. C. Bioactive flavonoides from endophyte-infected blue grass (*Poa ampla*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46,p. 3785-3788, 1998.

KAIJIANG, M. L.; ROBERTS, D. W. The production of destruxins by entomogenous fungus. *Metarhizium anisopliae* var, major. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 47, n.3, p. 120-122, 1986.

KANDA, K.; HIRAI, Y., KOGA, H. ; HASEGAWA, K. Endophyte-enhanced resistance in perennial ryegrass and tall fescue to bluegrass webworm. **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology**, v.38, p. 141-145, 1994.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia Médica**. 2ª ed. São Paulo: Editora Premier, p. 256, 1999.

KINDEL, L. L.; ANDREWS, J. H.; NORDHEIM, E. V. Fungal immigration dynamics and community development on apple leaves. **Microbial Ecology**, v.18, p. 45-58, 1989.

KINDLER, D.; BREEN, J. P.; SPRINGER, T. Russian wheat aphid resistance in cool-season grasses. **Journal of Economic Entomology**, v. 84, p. 685-692, 1990.

KIRFMAN, G. W.; BRANDENBURG, R. L.; GARNER, G. B. Relationship between insect abundance and endophyte infestation level in tall fescue in Missouri. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 59, p. 552-554, 1986.

KLEIN, M.; PODOLER, H. Studies on the application of a nuclear polyhedrosis virus to control populations of the Egyptian cottonworm, *Spodoptera littoralis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.32, p. 244-248, 1978.

KNOCH, T. R.; FAETH, S. H.; ARNOTT, D. L. Endophytic fungi alter dispersal by desert seed-harvesting ants. **Oecologia**, v. 95, p. 470-473, 1993.

KODAIRA, Y. Biochemical studies on the muscardine fungi in the silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of the Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu-University. Séries E Agriculture and Sericulture**, v. 5, p.1-68, 1961.

KODAIRA, Y. Studies on the new toxic substance to insects, destruxin A and B, produced by *Oospora destructor*. Part I. Isolation and purification of destruxin A and B. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v. 26, p. 36-42, 1962

KODAIRA, Y. Toxic substances to insects, produced by *Aspergillus ochraceus* and *Oospora destructor*. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v. 25, p. 261-262, 1969.

KOGA, H.; HIRAI, Y.; KANDA, K. ;TSUKIBOSHI, T. ; UEMATSU, T. Sucessive transmittion of resistance to bluegrass webworm to perennial ryegrass and tall fescue plantas by artificial inoculation with *Acremonium* endophytes. **Japan Agricultural Research Quaterly**, v. 31, p. 109-115, 1997.

KONEMAN, E. W. ; ROBERTS, G. D. **Micologia Prática de Laboratório**. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, 1987. 221p.

KOWALSKI,T.; SADLOWSKI, W. Endophytic fungi .I. Species composition ans occurrence. **Grzyby endofityczne I.Sklad gatunkowy i Wystepowame**, Sylwan, v.137, p. 21-30, 1993.

KOWALSKI, T.; KEHR, R .D.;REDLIN,S. C.; CARRIS, L. M. Fungal endophytes of living branch bases in several European tree species. **American Phytopathological Society** (APS Press), St Paul, Minesota, 1996, p. 67-86.

LARONE, D. H. **Medically important fungi : a guide to identification**. New York, Elsevier, 1987. 230p.

LASOTA, J. A.; WALDVOGEL, M. G.; SHETLAR, D .J. Fungus found in galls of *Adelges abietis* (L.) (Homoptera: Adelgidae): identification, within-tree distribution, and possible impact on insect survival. **Environmental Entomology**, v.12, p. 245-246, 1983.

LATCH, G. C. M.; CHRISTENSEN, M. J. Artificial infections of grasses with endophytes. **Annals of Applied Biology**, v. 107, p. 17-24, 1985.

LATCH, G .C. M.; CHRISTENSEN, M. J.; GAYNOR, D. L. Aphid detection of endophyte infection in tall fescue. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.28, p. 129-132, 1985.

LATCH, G. C. M., HUNT, W. F.; MUSGRAVE, D. R. Endophyte fungi affect growth of perennial ryegrass. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.28, p. 129-132, 1985 b.

LECUONA, R. E. **Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga**. Castela: R. E. Lecuona editor, 1996. 338p.

LEGAUT, D.; DESSUREAUT, M.; LAFLAME, G. Mycoflora des aiguilles de *Pinus banksiana* et *Pinus resinosa* needles. Ichampignons endophytes. **Canadian Journal of Botany**, v.67, p. 2052-2060, 1989 a.

LEGAUT, D.; DESSUREAUT, M.; LAFLAME, G. Mycoflora of *Pinus banksiana* and *Pinus resinosa* needles. II. Epiphytic fungi. **Canadian Journal of Botany**, v.67, p. 2061-2065, 1989 b.

LEUCHTMANN, A. Systematics, distribution, and host specificity of grass endophytes. **Natural Toxins**, v. 1, p. 150-162, 1992.

LEUCHTMANN, A.; CLAY, K. Experimental infection of host grasses and seedeges with *Atkinsonella hypoxylon* and *Balansia cyperi* (Balansiae, Clavivipitacea). **Mycologia**, v. 80, p. 299-297, 1988.

LEUCHTMANN, A.; PETRINI, O; PETRINI, L. E.; CARROLL, G. C. Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* species. **Mycological Research**, v. 96, p. 287-95, 1992.

LEWIS, G. C. ; BING, L. A *Bacillus thuringiensis* Berliner and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin for European corn borer control: Potential for immediate and season-long supression. **Canadian Entomologist**, v. 123, p. 387-393, 1991.

LEWIS, G. C.; CLEMENT, R. O. A survey of ryegrass endophyte (*Acremonium lolii*) in the U.K. and its apparent ineffectuality on a seedling pest. **Journal of Agricultural Science**, v. 107, p. 633-638, 1986.

LEWIS, G. C.; VAUGHAM, B. Evaluation of a fungal endophyte (*Neotyphodium lolii*) for control of leatherjackets (*Tipula* spp.) in perennial ryegrass. **Tests of Agrochemicals and Cultivars**, v. 18, p. 34-35, 1997.

LEZAMA, R.; ALATORRE, R.; HERNANDEZ, J. L.; GONZALEZ, H. In vitro sensivity of fall armyworm larvae (*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) to the fungi *Paecilomyces fumoso-roseus* (Wize) Brown e Smith, and *Nomuraea rileyi* (F.) Samson. **Advances en Investigation Agropecuaria** , v.2, p. 90-99, 1993.

LOGRIECO, A; MORETTI, A; ALTOMARE, C.; BOTTALICO, A ; TORRES, E. C. Ocorrence and toxicity of *Fusarium subglutinans* from *Peruviam maize*. **Mycopathologia**, v. 122, p. 85-190, 1996.

LONGO, A C. Transformação genética e variabilidade detectada po RAPD em isolados endofíticos de *Colletotrichum musae*. Piracicaba, 1995. 101p. Tese- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- Universidade de São Paulo.

LU, H.; ZOU, W.X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., na endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v.151, p. 67-73, 1999.

MATHIAS, J. K. RATXCLIFFE, R. H. ; HELMAN, J. L.; Association of na endophytic fungus in perennial ryegrass and resistance to the hairy chinch bug (Hemiptera:Lygaeidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 83, p. 1640-1646, 1990.

MCCUTCHEON, T. L.; CARROLL, G. C.; SCHWAB, S. Genotypic diversity in populations of fungal endophyte from Douglas Fir . **Mycologia**, v. 85, p. 180-186, 1993.

MCONIE, K. C. The latent occurrence in *Citrus* and other hosts of a *Guignardia* easily confuses with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen, **Phytopathology**, v. 54, p. 40-43, 1964.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. v. 1, 262p.

MILLER, J. D. Toxic metabolites of epiphytic and endophytic of conifer needles. In **Microbiology of the Phyllosphere**. FOKKEMA, N. J. ;VAN DEN HEUVEL (edts) Cambridge University Press, Cambridge , pp.221-231, 1986.

MILLER, W. A.; ROY, K. W. Mycoflora of soybean leaves, pods, and seeds in Mississippi. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, p. 2716-2723, 1982.

MILES, C. O; MENNA, M. E.; JACOBS, S. W. L.; GARTHWAITE, I.; LANE, G. A; PRESTIDGE, R. A; MARSHALL, S. L.; WILKINSON, H. H.; SCHARDE, C. L.; BALL, O J. P.; LATCH, G. C. M. Endophytic fung in Indigineous Australasian grasses associated with toxicity to livestock. **Applied Environmental Microbiology**., v. 64, p. 601-606, 1998.

MORGAN-JONES, G., GAMS, W. Notes on Hyphomycetes XLI. An endophyte of *Festuca arundinacea* and the anamorph of *Epichloë typhina*, new taxa in one of two new sections of *Acremonium*. **Mycotaxon**, v.15, p. 311-318, 1982.

MOSCARDI, F. Utilização de *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*. Londrina, EMBRAPA-CNPSO, 1983.13 p. (Comunicado

técnico, 23).

MOSCARDI, F. Utilização de vírus para controle da lagarta-da-soja. In: ALVES, S. B.coord. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Editora Manole. 1986. p. 188-202.

MOSCARDI, F.Soybean IPM programme in Brazil. FAO/UNEP/USSR.WORKSHOP ON INTEGRATED PEST MANAGEMENT, KISHNEY, Moldavia, 20 p .1990.

MOSCARDI, F. CORRÊA-FERREIRA, B. S. HOFFMANN OLIVEIRA, E. B. de BOUCIAS, D. G. Ocorrência de entomopatógenos em lepidópteros que atacam a cultura da soja no Paraná. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Resultados de Pesquisa de Soja**. 1983/1984. Londrina, 1984. p. 217.

MUEGGE, M. A; QUISENBERRY, S. S.; BATES, B. A; JOOST, R. E. Influence of *Acremonium* infection and pesticide use on seasonal abundance of leafhoppers froghoppers (Homoptera:Cicadellidae, Cercopidae) in tall fescue. **Environmental Entomology**, v.20, p. 1531-1536, 1991.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures **Physiology Plant.**, v.15,p.473-497, 1962.

MURPHY, J. A.; SUN, S; BETTS, L. L. Endophyte-enhanced resistance to billbug (Coleoptera: Curculionidae), sod webworm (Lepidoptera: Piralidae) and white grub (Coleoptera: Sacarabeidae) in tall fescue. **Environmental Entomology**, v. 22, p. 699-703, 1993.

MURRAY, F. R.; LATCH, G. C. M.; SCOTT, D. B. Surrogate transforamtion of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium*

endophyte. **Molecular Genetics**, v. 233, p. 1-9, 1992.

MYOKEY, R.; SAMURAI, A; CHANG , C.F.; KODAIRA, Y.; TAKAHASHI,N.; TAMURA, S. Aspochracin, a new inseticidal metabolite of *Aspergillus ochraceus*. Part I. Isolation, structure ans biological activities. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v. 33, p. 1491-1494,1969.

NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; ZUCCHI, R. A. **Entomologia Econômica**. São Paulo: Livroceres, 1981, 314 p.

OKANE, I. NAKAGINI, A; ITO, T. Endophytic fungi in leaves of ericaceous plants. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, p. 657-663, 1998.

OVCHNNIKOV, Y. A membrane active complexones. Chemistry and Biological function. **Febs Letters**, v. 44, p. 01-21, 1974.

PAMPFILE, J. A. Variabilidade, transformação genética e transposons em linhagens endofíticas de *Fusarium moniliforme* isoladas de milho (*Zea mays* L.), Piracicaba,1997. 166 p. Tese – Escola Superior “Luiz de Queiroz”- Universidade de São Paulo

PATTERSON, C. G.; POTTER, D. A.; FANNIN, F. F. Feeding deterreny of alkaloids from endophyte-infected grasses to japanese beetle grubs. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v .61, p. 285, 1992.

PENNA, E. B. da S. Microrganismos endofíticos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* , ST. HIL.) e variabilidade genética em *Phyllosticta* sp. por RAPD. Curitiba, 2000. 130 p. Dissertação, Universidade Federal do Paraná.

PETERS, S.; DRAEGER, S.; AUST, H. J.; SCHULZ, B. Interactions in dual cultures of endophytic fungi with host and nonhost plant calli. **Mycology**, v. 90, p. 360-367, 1998.

PEREIRA, J. O. Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish*. Piracicaba, 1993. 105p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a preliminary study. **Mycologia**, v. 85, p. 362-364, 1993.

PEREIRA, J.O. ;VIEIRA, M. L. C. ; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal Microbiology. Biotechnology**, v.15, p. 43-46, 1999.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J. HEUVEL, J. VAN DEN (Ed), **Microbiology of the Phyllosphere**. Cambridge University Press, 1986, p. 175-87.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWA, J.; HIRANO, S. S. (Ed). **Microbial ecology of leaves**. Springer Verlag, 1991, p.179-97.

PETRINI, O.; MÜLLER, E. Pilzliche Endophyten am Beispiel von *Juniperus communis* L. **Sydowia**, v. 32, p. 223-251. 1979.

PETRINI, O; CARROLL, G. Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon. **Canadian Journal Botany**, v.59, p. 629-636, 1981.

PETRINI, O ; FISHER, P., J. Occurrence of fungal endophytes in twigs of *Salix fragilis* and *Quercus robur*. **Mycological Research**, v. 94, p. 1077-1080, 1990.

PETRINI, O.; STONE, J.; CARROLL, F. E. Endophytic fungi evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal Botany**, v. 60, p. 789-796, 1982.

PETRINI, L. E.; PETRINI, O.; LAFLAME, G. Recovery of endophytes of *Abies balsamea* from needles and galls of *Paradiplosis tumifex*. **Phytoprotection**, v. 70, p. 97-103, 1989.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite, production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v. 1, p. 185-196, 1992.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**,. Ed. São Paulo, Nobel, 1985, 466p.

POTTER, D. A.; PATTERSON, C. G.; REMOND, C. T. Influence of turfgrass species and tall fescue endophyte on feeding ecology of japanese beetle and southern masked chafer grubs (Coleoptera:scarabeidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 900-909, 1992.

PRESTIDGE, R. A.; GALLAGHER, R. T. Endophyte conifers resistance to ryegrass: Argentine stem weevil larval studies. **Ecological Entomology**, v. 13, p. 429-435, 1988.

PRESTIDGE, R. A.; ZIPP, S.; BADAN, D. Effects of Argentine stem weevil on pastures in Central Volcanic Plateau. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, v. 12, p. 323-331, 1984.

RAPS, A.; VIDAL, S. Indirect effects of na unspecialized endophytic fungus on specialized plant-herbivorous interactions. **Oecologia**, v. 114, p. 541-547, 1998.

REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. St. Paul: The American Phytopathological Society Press, 1996. 223p.

RIBEIRO, L. A Variabilidade genética por RAPD em fungos endofíticos do gênero *Penicillium* provenientes de *Zea mays*. Curitiba, 1995. 90p. Dissertação (M.S.)- Universidade Federal doParaná.

RICHARDSON, M. D.; CABRERA, R. I.; MURPHY, J. A; ZAUROV, D. E. Nitrogen from and endophyte-infection effects on growth, nitrogen uptake and alkaloid content of chewing fescue turfgrass. **Journal of Plant Nutrition**, v. 22, p. 67-79, 1999.

RIEDEL, W. E.; KIECKHEFER, R. E.; PETROSKI, R. J.; POWELL, R. G. Naturally-occurring and synthetic loline alkaloid derivatives: Insect feeding behaviour modification and toxicity. **Journal of Entomological Science**, v. 26, p. 122-129, 1991.

RIESEN, T. K.; CLOSE, R. C. Endophytic fungi in propiconazole-treated and untreated barley leaves. **Mycologia**, v.79, p. 546-552, 1987.

ROBBS, C. F. **Relatório de atividades fitossanitárias na MAISA (Mossoró Agroindustrial S. A, Mossró, RN)** Não publicado, 1994.

ROBBS, C. F., BITTENCOURT, A M. Controle Biológico de Insetos – O controle biológico de Insetos Nocivos à Agricultura com o Emprego de Fungos imperfeitos ou Hifomicetos. **Biotecnologia , Ciência e Desenvolvimento**, São Paulo, ano II, julho/agosto, p. 10-12, 1998.

RODRIGUES, K. F.; SAMUELS, G. J. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. **Mycological Research**, Cambridge, v.94, p. 827-30, 1990.

RODRIGUES, K. F.; SAMUELS, G. J. *Letendraeopsis palmarum*, a new genus and species of cleistothecial Loculoascomycetes. **Mycologia**, v. 86, p. 254-258, 1994.

RODRIGUES, K. F.; PETRINI, O. Biodiversity of the endophytic fungi in tropical regions. In: Hyde, K. D. **Diversity of Tropical Microfungi**. Hong Kong, Editora: University of Hong Kong Press, 1997, p. 57-69.

RODRIGUES, K. F.; SAMUELS, G. J. Fungal endophytes of spondias mombin leaves in Brazil. **Journal Basic Microbiology**, v.39, p. 131-135, 1999.

RODRIGUEZ, R. J.; REDMAN, R. S. Fungal life-styles and ecosystems dynamics Biological aspects of plant pathogens, plant endophytes and saprophytes. **Advances in Botanical Research.**, v.24, p. 169-193, 1997.

ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E.; SPIELMAN, L. J. **A literature guide for the identification of plant pathogenic fungi**. St Paul, APS Press, 1987. 252p.

SAHA, D. C.; JOHNSON-CICALESE, J. M.; HALISKY, P. M.; HEEMSTRA, M. I.; FUNK, C. R..Occurrence of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.71, p. 1021-1024, 1987.

SAVADORI, J. R. GÓMEZ, S. A Abundância estacional de insetos pragas da soja e seus inimigos naturais em Dourados, M. S. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, Recife, 1991. Resumos , Sociedade Entomológica do Brasil, 1991,v. 1,p.248.

SCHARDL, C. L. ; PHILLIPS, T. D. Protective grass endophytes: Where are they from and where are they going? **Plant Disease**, v. 81, p. 430-438, 1997.

SCHULZ, B.; WANKE, U.; DRAEGER, S.; J-AUST, H. Endophytes from herbaceous

plants and Shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological Research**, v.97, p. 1447-50, 1993.

SCHULZ B.; GUSKE, S. ; DAMANN, U.; BOYLE, C. Endophyte-Host-Interaction . II. Defining Symbiosis of the Endophyte-host Interaction . **Symbiosis**, v.25, p. 213-227, 1998.

SHERWOOD-PIKE, M.; STONE, J. K.; CARROL, G. C. *Rhabdocline parkeri*, a ubiquitous foliar endophyte of Douglas-fir. **Canadian Journal of Botany**, v. 64, p. 1849-1855, 1986.

SIEBER, T. N.; DORWORTH, C. E. An ecological study about assemblages of endophytic fungi in *Acer macrophyllum* in British Columbia: in search of candidate mycoherbicides. **Canadian Journal of Botany**, v.72, p. 1397-1402, 1994.

SIEBER, T.; RIESEN, T. K.; MÜLLER, E ; FRIED, P. M. Endophytic fungi in four winter wheat cultivars (*Triticum sativum* L.) differing in resistance against *Stagonospora nodorum* (Berk.) Cast & Germ=Septoria nodorum (Berk.)Berk. **Journal of Phytopathology**, v. 122, p. 289-306, 1988.

SIEGEL, M. R.; LATCH, G. C. M.; BUSH, L. P.; FANNIN, F. F.; ROWAN, D. D.; TAPPER, B. A; BACON, C. W.; JOHNSON, M. C. Fungal endophyte-infected grasses: Alkaloid accumulation and aphid response . **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, p. 3301-3316, 1990.

SILVA, M. T. B. Controle da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hubner Lepidoptera Noctuidae. Controle biológico natural. **Ciência Rural**, v. 23, n. 2, p. 127-132, 1993.

SILVEIRA, V. D. **Micologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995. 336 p.

SINCLAIR, J. B. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. **Plant Disease**, St Paul, v. 75, p. 220-224, 1991.

SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. **Compendium of Soybean Disease**, 3 rd ed. American Phytopatology Society, St. Paul, MN, 1989, p. 106.

SNETSELAAR, K. M.; MIMS C. W. Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. **Mycological Research**, v. 98, p. 347-55, 1994.

SÓSA-GOMEZ, D. R.; MOSCARDI, F. Suceptibilidade diferencial de insetos pragas da soja a fungos entomopatogênicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, Recife, 1991. Resumos. Recife, Sociedade Entomológica do Brasil, 1991, v. 1., p. 248.

SOUZA, A O. Isolamento e identificação de bactérias endofíticas de milho (*Zea mays* L.) e análise de sua variabilidade genética por RAPD. Piracicaba, 1996. 88p. Dissertação (M.S.)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

SOUZA, A.O.; AZEVEDO, J. L. Interação de bactérias e fungos endofíticos isolados de milho (*Zea mays* L.) In: Reunião Anual de Genética de Microrganismos, 20., 1995, Piracicaba. Resumos. Piracicaba: ESALQ/USP, 1995. p. 126.

SPURR, H. W.; WELTY, R. E. Characterization of endophytic fungi in healthy leaves of *Nicotiana* spp. **Phytopatology**, v. 65, p. 417-22, 1975.

SRIDHAR, K. R.; RAVIJARA, N. S. Endophytes- A crucial issue. **Current Science**, v. 69, p. 570-571, 1995.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by

*Taxomyces andreane*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D.; GROTHAUS, P.; BIGNAMI, G. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific Yew, *Taxus brevifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 1315-1324, 1995.

STOFELLA, D. R. E. Variabilidade morfológica da região faríngea dos arcos branquiais de algumas espécies de peixes (Teleostei), estudada através da microscopia eletrônica de varredura. Curitiba, 1994. 125p. Tese- Universidade Federal do Paraná.

STONE, J. K. Foliar endophytes of *Pseudotsuga menzeli* (mirb.) Franco. Cytology and physiology of the host-endophyte relationship. **Eugene**, 124 p. (PhD). University of Oregon, 1986.

STONE, J. K. Fine structure of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir with observations on uninfected epidermal cells. **Canadian Journal of Botany**, v. 66, p. 45-54, 1988.

TANADA, Y.; REINER, C. The use of pathogens in the control of the corn earworm *Heliothis zea* (Boddie). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 4, p. 139-154, 1962.

TAPER, M. L.; CASE, T. J. Interactions between oak tannins and parasite community structure: unexpected benefits of tannins to cypinid gall-wasps. **Oecologia**, v. 71, p. 254-261, 1987.

TAPER, M. L.; ZIMMERMAN, E. M.; CASE, T. J. Sources of mortality for a cypinid gall-wasp (*Dryocosmus dubiosus* (Hymenoptera: Cynipidae): the importance of the tannin/fungus interaction. **Oecologia**, v. 68, p. 37-445, 1986.

TOR, M.; MANTELL, S. H.; AINSWORTH, C. Endophytic expressing beta-glucuronidase cause false positives in transformation of *Discorea* species. **Plant Cell Reports**, v. 11, p. 452-456, 1992.

TIBBETS, T. M.; FAETH, S. H. *Neotyphodium* endophytes in grasses: deterrent or promoters of herbivory by leaf-cutting ants? **Oecologia**, v. 118, p. 297-305, 1999.

TSAI, H. F.; SIEGEL, M. R.; SCHARDL, C. L. Transformation of *Acremonium coenophialum*, a protective fungal symbiont of the grass *Festuca arundinacea*. **Current Genetics**, v. 22, p. 399-406, 1992.

TUDZYNSKI, P.; HOLTER, K.; CORREIS, T.; ARNTZ, C.; GRAMMEL, N.; KELLER, U. Genetics of alkaloid biosynthesis in *Claviceps purpurea*: evidence for a gene cluster. **Fungal Genetics Newsletter**, v. 46. suppl.,140, 1999.

TURNIPSEED, S. G.; KOOGAN, M. Soybean entomology. **Annual Review of Entomology**, v. 21, p. 247-282, 1976.

VAN-HEESWIJCK, R.; MCDONALD, G. *Acremonium* endophyte in perennial ryegrass and other pasture grasses in Australia and New Zealand. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 43, p. 1683-1709, 1992.

VENEDIKIAN, N. Análisis de la microflora en hoja viva de *Pinus taeda*. **Physis**, v. 42, p.7-16,1984.

VEY, A.;QUIOT, J. M.;VAGO, C.; FARGUES, J. Immunodepressive effect of fungal toxins inhibition of the reaction of multicellular encapsulation by destruxins. **Royal Academy of Science**, v. 300, p. 647-651, 1985.

VICENTE, V. A. Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose.

Piracicaba, 2000. 200p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

VIRET, O.; PETRINI, O. Colonization of beech leaves (*Fagus sylvatica*) by the endophyte *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomonina errabunda*) **Mycological Research**, v. 98, p. 423-32, 1994.

WAGNER, B.; LEWIS, L. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3468-3473, 2000.

WANG, J.; MACHADO, C. PANACCIONE, D.; SCHARDL, C. Ergot alkaloid biosynthesis genes cloned from *Claviceps* and *Balansia*. **Fungal Genetics Newsletter**, v. 46, suppl., p. 120, 1999.

WEBBER, J. A natural control of Dutch elm disease. **Nature**, v.292, p. 449-451, 1981.

WENNSTROM, A. Endophyte: the misuse of an old term. **Oikos**. v. 71, p. 535-536, 1994.

WEST, E. J.; BUGGS, J. D. "In vitro" toxin product by the fungus *Beauveria bassiana* and bioassay in eater was larval. **Journal of Economic Entomology**, v. 61, p. 684-87, 1968.

WHITE JR. J. F.; COLE, G. T. Endophyte-host associations in forage grasses. I. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*. **Mycologia**, v. 77, p. 323-327, 1985.

WHITE JR. J. F.; COLE, G. T. Endophyte-host associations in forage grasses.V. Occurrence of fungal endophytes in certain species of *Bromus* and *Poa*. **Mycologia**, v.

78, p. 846-850, 1986.

WHITE JR., J. F.; GLENN, A. E.; CHANDLER, K. F. Endophyte-host associations in grasses XVII- Moisture and insect herbivory of the emergent stromal leaf of *Epichloë*. **Mycologia**, v. 85, p. 195-202, 1993.

WHITE JR., J. F.; MORGAN-JONES, G.; MORROW, A. C. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. **Agricultural Ecosystems Environmental**, v. 44, p. 13-37, 1993.

WHITE JR., J. F.; MORROW, A. C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte on *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia**, v. 82, p. 218-226, 1990.

WHITE JR., J. F.; MORROW, A. C.; MORGAN-JONES, G.; CHAMBLESS, D. A. Endophyte-host associations in forage grasses. XIV. Primary stromata formation and seed transmission in *Epichloë typhina*: developmental and regulatory aspects. **Mycologia**, v.82, p.72-81, 1991.

WHITLOCK, V. H. Simultaneous treatments of *Heliothis armigera* with nuclear polyhedrosis virus and granulose virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 29, p. 297-303, 1977.

WILSON, A. D.; CLEMENTE, S. L.; KAISER, W. J. Survey and detection of endophytic fungi in *Lolium* germplasm by direct staining and aphyi assays. **Plant Disease**, v. 75, p. 169-73, 1991.

WILSON, D. Fungal endophytes: out of site but should not be out of mind. **Oikos**, v.68, p. 379-384. 1993.

WILSON, D. Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, v.73, p. 274-276. 1995.

WILSON, D.; CARROLL, G. C. Avoidance of high-endophyte space by gall-forming insects. **Ecology**, p. 2153-2163, 1997.

WILSON, R.; WHEATCROFT, R.; MILER, J. D. ;WHITNEY, N. J. Genetic diversity among natural populations of endophytic *Lophodermium pinastri* from *Pinus resinosa*. **Mycological Research**, v. 98, p. 740-744, 1995.

YONG, C.; MCMILLAN, L.; SCOTT, B. Molecular cloning of indole-diterpenoid gene cluster from *Penicillium paxilii*. **Fungal Genetics Newsletter**, v. 46, suppl., p. 121, 1999.

ANEXO 1 - ANOVA RELATIVA AOS DADOS DA FREQUÊNCIA DE FUNGOS ISOLADOS DO MILHO TRANSFORMADOS PARA LOG (X+2)

F.V.	GL		QM	F
Tratamentos	95		0.0422	2.798717
A	1		0.868271	57,64264 **
B	1		0.575715	38,22044 **
C	1		0.005413	0,35937 n.s.
D	1		0.000004	0,00297 n.s.
E	2		0.117724	7,815463 **
F	1		0.029408	1,95233 n.s.
AxB	1		0.292851	19,44174 **
AxC	1		0.119667	7,94440 **
AxD	1		0.005351	0,35523 n.s.
AxE	2		0.065778	4,36688 *
AxF	1		0.217611	14,4467 **
BxC	1		0.02752	1,82701 n.s.
BxD	1		0.003896	0,25866 n.s.
BxE	2		0.023277	1,5453 n.s.
BxF	1		0.000009	0,006016 n.s.
CxD	1		0.034771	2,308403 n.s.
CxE	2		0.002535	0,168261 n.s.
CxF	1		0.340523	22,58732 **
DxE	2		0.003202	0,212584 n.s.
DxF	1		0.01874	1,244093 n.s.
ExF	2		0.015593	1,035182 n.s.
Resíduo	260		0.0151	
Total	287			

C.V. = 29.50% Onde:

F.V. = fonte de variação

G.L. = graus de liberdade

F = Teste de Snedecor

A - origem (campo ou casa de vegetação)

B - temperatura (28°C ou 37°C)

C - órgãos da planta (folha ou caule)

D - partes da planta (parte inferior ou parte superior)

E - meios de cultura (AA, BDA ou AFA)

F - idade das plantas (20 dias ou 40 dias)

AxB - interação origem e temperatura

AxC - interação origem e órgãos da planta

AxD - interação origem e partes da planta

AxE - interação origem e meios de cultura

AxF - interação origem e idade das plantas

BxC - interação temperatura e órgãos da planta

BxD - interação temperatura e regiões da planta

BxE - interação temperatura e meios de cultura

BxF - interação temperatura e idade das plantas

CxD - interação órgãos da planta e regiões

CxE - interação órgãos da planta e meios de cultura

CxF - interação órgãos da planta e idade das plantas

DxE - interação regiões e idade das plantas

DxF - interação regiões e idade das plantas

ExF - interação meios de cultura e idade das plantas

C.V. = coeficiente de variação

Q.M. = quadrado médio

\*\* = significância à 1%

\* = significância à 5%

n.s = não significativo

ANEXO 2 – ANOVA RELATIVA AOS DADOS DA FREQUÊNCIA DE FUNGOS ISOLADOS DA SOJA TRANSFORMADOS PARA LOG (X+2)

F.V.	GL		QM	F	
Tratamentos	95		0.0671974	6.493358	
A	1		1,14998	111,1246	**
B	1		1,730219	167,1929	**
C	1		0,004975	0,480733	n.s.
D	1		0,090895	8,783319	**
E	2		0,574994	55,56231	**
F	1		0,025335	2,448113	n.s.
AxB	1		1,209551	116,8802	**
AxC	1		0,004713	0,455396	n.s.
AxD	1		0,1130936	12,65253	**
AxE	2		0,001632	0,157744	n.s.
AxF	1		0,483169	46,68911	**
BxC	1		0,119201	1,51849	**
BxD	1		0,006385	0,61701	n.s.
BxE	2		0,010613	1,025534	n.s.
BxF	1		0,008681	0,838901	n.s.
CxD	1		0,000195	0,018853	n.s.
CxE	2		0,017174	1,659554	n.s.
CxF	1		0,024273	2,345491	n.s.
DxE	2		0,008301	0,802121	n.s.
DxF	1		0,03019	2,917287	n.s.
ExF	2		0,019124	1,847971	n.s.
Resíduo	260		0.010348		
Total	287				

C.V. = 23.17%

Onde:

F.V. = fonte de variação

G.L. = graus de liberdade

F = Teste de Snedecor

A - origem (campo ou casa de vegetação)

B - temperatura (28°C ou 37°C)

C - órgãos da planta (folha ou caule)

D - partes da planta ( parte inferior ou parte superior )

E - meios de cultura ( AA, BDA ou AFA )

F - idade das plantas ( 20 dias ou 40 dias )

AxB - interação origem e temperatura

AxC - interação origem e órgãos da planta

AxD - interação origem e partes da planta

AxE - interação origem e meios de cultura

AxF - interação origem e idade das plantas

BxC - interação temperatura e órgãos da planta

BxD - interação temperatura e partes da planta

BxE - interação temperatura e meios de cultura

BxF - interação temperatura e idade das plantas

CxD - interação órgãos da planta e partes

CxE - interação órgãos da planta e meios de cultura

CxF - interação órgãos da planta e idade das plantas

DxE - interação partes e idade das plantas

DxF - interação partes e idade das plantas

ExF - interação meios de cultura e idade das plantas

C.V. = coeficiente de variação

Q.M. = quadrado médio

\*\* = significância à 1%

\* = significância à 5%

n.s. = não significativo

ANEXO 3 - ANOVA RELATIVA AOS DADOS DA FREQUÊNCIA DE FUNGOS ISOLADOS DO MILHO TRANSFORMADOS PARA  $\sqrt{X+0.5}$

F.V.	GL	SQ	F
Gêneros	8	2,697549	0,0001 *
Origem	1	1,025741	0,0001 *
Idade da planta	1	0,042774	0,2169 n.s.
Temperatura	1	0,521812	0,0001 *
Órgãos	1	0,002667	0,7578 n.s.
Partes	1	0,026912	0,3273 n.s.
Meios	2	0,435904	0,0004 *
Gêneros x origem	8	2,277286	0,0001 *
Gêneros x idade da planta	8	0,509807	0,0202 *
Gêneros x temperatura	8	0,802330	0,0004 *
Gêneros x órgão	8	2,153121	0,0001 *
Gêneros x partes	8	0,089626	0,9213 n.s.
Gêneros x meios	16	0,474465	0,3914 n.s.
Idade x órgãos x partes	4	0,583197	0,0004 *
Resíduo	2514	70,493538	
Total	2591	82,168315	

C.V. = 22,35%

Onde:

F.V. = fonte de variação

C.V. = coeficiente de variação

G.L. = graus de liberdade

S.Q. = soma dos quadrados

F = Teste de Snedecor

origem (campo ou casa de vegetação)

temperatura (28°C ou 37°C)

órgãos da planta (folha ou caule)

partes da planta (parte inferior ou parte superior)

meios de cultura (AA, BDA ou AFA)

idade da planta (20 dias ou 40 dias)

\* = significância à 5%

n.s = não significativo

ANEXO 4 - REPRESENTAÇÃO DAS MÉDIAS COM OS RESPECTIVOS GÊNEROS DO MILHO DENTRO DA ORIGEM CAMPO EM ORDEM DECRESCENTE, ASSIM COMO DA LETRA SÍMBOLO QUE REPRESENTA IGUALDADE DAS MESMAS.

Gêneros	Média	Significância
1 Dematiáceos	0,90328	A
3 <i>Fusarium</i> sp.	0,83102	A B
4 <i>Acremonium</i> sp.	0,77181	B C
2 <i>Colletotrichum</i> sp.	0,75670	B C
7 <i>Mycelia sterilia</i>	0,74890	C
5 <i>Aspergillus</i> sp.	0,74305	C
6 <i>Penicillium</i> sp.	0,74193	C
8 <i>Paecilomyces</i> sp.	0,71430	C
9 <i>Beauveria</i> sp.	0,71070	C

ANEXO 5 - REPRESENTAÇÃO DAS MÉDIAS COM OS RESPECTIVOS GÊNEROS DO MILHO DENTRO DA ORIGEM CASA DE VEGETAÇÃO EM ORDEM DECRESCENTE, ASSIM COMO DA LETRA SÍMBOLO QUE REPRESENTA IGUALDADE DAS MESMAS.

Gêneros	Média	Significância
2 <i>Colletotrichum</i> sp.	0,78072	A
6 <i>Penicillium</i> sp.	0,74665	A B
3 <i>Fusarium</i> sp.	0,74081	A B
1 Dematiáceos	0,72396	B
5 <i>Aspergillus</i> sp.	0,72149	B
4 <i>Acremonium</i> sp.	0,71430	B
7 <i>Mycelia sterilia</i>	0,71430	B
8 <i>Paecilomyces</i> sp.	0,71070	B
9 <i>Beauveria</i> sp.	0,71070	B

ANEXO 6 - REPRESENTAÇÃO DAS MÉDIAS COM OS RESPECTIVOS GÊNEROS DO MILHO DENTRO DA IDADE DA PLANTA DE 20 DIAS EM ORDEM DECRESCENTE, ASSIM COMO DA LETRA SÍMBOLO QUE REPRESENTA IGUALDADE DAS MESMAS.

Gêneros	Média	Significância
3 <i>Fusarium</i> sp.	0,79576	A
1 Dematiáceos	0,78148	A
2 <i>Colletotrichum</i> sp.	0,77713	A B
6 <i>Penicillium</i> sp.	0,75384	A B C
5 <i>Aspergillus</i> sp.	0,75384	A B C
4 <i>Acremonium</i> sp.	0,75024	A B C
7 <i>Mycelia sterilia</i>	0,74193	A B C
8 <i>Paecilomyces</i> sp.	0,71430	B C
9 <i>Beauveria</i> sp.	0,71070	C

ANEXO 7 - REPRESENTAÇÃO DAS MÉDIAS COM OS RESPECTIVOS GÊNEROS DO MILHO DENTRO DA IDADE DA PLANTA DE 40 DIAS EM ORDEM DECRESCENTE, ASSIM COMO DA LETRA SÍMBOLO QUE REPRESENTA IGUALDADE DAS MESMAS.

Gêneros	Média	Significância
1 Dematiáceos	0,84576	A
3 <i>Fusarium</i> sp.	0,77607	B
2 <i>Colletotrichum</i> sp.	0,76030	B C
4 <i>Acremonium</i> sp.	0,73586	B C
6 <i>Penicillium</i> sp.	0,73474	B C
7 <i>Mycelia sterilia</i>	0,72126	B C
5 <i>Aspergillus</i> sp.	0,71070	C
8 <i>Paecilomyces</i> sp.	0,71070	C
9 <i>Beauveria</i> sp.	0,71070	C

ANEXO 8 - REPRESENTAÇÃO DAS MÉDIAS COM OS RESPECTIVOS GÊNEROS DO MILHO DENTRO DA TEMPERTAURA DE 28°C EM ORDEM DECRESCENTE, ASSIM COMO DA LETRA SÍMBOLO QUE REPRESENTA IGUALDADE DAS MESMAS.

Gêneros	Média	Significância
1 Dematiáceos	0,85576	A
3 <i>Fusarium</i> sp.	0,83349	A B
2 <i>Colletotrichum</i> sp.	0,78006	B C
4 <i>Acremonium</i> sp.	0,76103	B C
6 <i>Penicillium</i> sp.	0,74193	C
7 <i>Mycelia sterilia</i>	0,74081	C
5 <i>Aspergillus</i> sp.	0,73586	C
8 <i>Paecilomyces</i> sp.	0,71070	C
9 <i>Beauveria</i> sp.	0,71070	C

ANEXO 9 - REPRESENTAÇÃO DAS MÉDIAS COM OS RESPECTIVOS GÊNEROS DO MILHO DENTRO DA TEMPERTAURA DE 37°C EM ORDEM DECRESCENTE, ASSIM COMO DA LETRA SÍMBOLO QUE REPRESENTA IGUALDADE DAS MESMAS.

Gêneros	Média	Significância
1 Dematiáceos	0,77148	A
2 <i>Colletotrichum</i> sp..	0,75736	A B
6 <i>Penicillium</i> sp.	0,74665	A B
3 <i>Fusarium</i> sp.	0,73834	A B
5 <i>Aspergillus</i> sp.	0,72868	A B
4 <i>Acremonium</i> sp.	0,72508	A B
7 <i>Mycelia sterilia</i>	0,72238	A B
8 <i>Paecilomyces</i> sp.	0,71430	B
9 <i>Beauveria</i> sp.	0,71070	B

ANEXO 10 - REPRESENTAÇÃO DAS MÉDIAS COM OS RESPECTIVOS GÊNEROS DO MILHO DENTRO DO ÓRGÃO – COLMO EM ORDEM DECRESCENTE. ASSIM COMO DA LETRA SÍMBOLO QUE REPRESENTA IGUALDADE DAS MESMAS.

Gêneros	Média	Significância
2 <i>Colletotrichum</i> sp.	0,80380	A
3 <i>Fusarium</i> sp.	0,79889	A B
6 <i>Penicillium</i> sp.	0,75743	A B C
5 <i>Aspergillus</i> sp.	0,74305	B C
1 Dematiáceos	0,73834	C
7 <i>Mycelia sterilia</i>	0,73474	C
4 <i>Acremonium</i> sp.	0,73227	C
8 <i>Paecilomyces</i> sp.	0,71430	C
9 <i>Beauveria</i> sp.	0,71070	C

ANEXO 11 - REPRESENTAÇÃO DAS MÉDIAS COM OS RESPECTIVOS GÊNEROS DO MILHO DENTRO DO ÓRGÃO - FOLHA EM ORDEM DECRESCENTE. ASSIM COMO DA LETRA SÍMBOLO QUE REPRESENTA IGUALDADE DAS MESMAS.

Gêneros	Média	Significância
1 Dematiáceos	0,88890	A
3 <i>Fusarium</i> sp.	0,77294	B
4 <i>Acremonium</i> sp.	0,75384	B
2 <i>Colletotrichum</i> sp.	0,73362	B
6 <i>Penicillium</i> sp.	0,73115	B
7 <i>Mycelia sterilia</i>	0,72845	B
5 <i>Aspergillus</i> sp.	0,72149	B
8 <i>Paecilomyces</i> sp.	0,71070	B
9 <i>Beauveria</i> sp.	0,71070	B

ANEXO 12 - ANOVA RELATIVA AOS DADOS DA FREQUÊNCIA DE FUNGOS ISOLADOS DA SOJA TRANSFORMADOS PARA  $\sqrt{X+0.5}$

F.V.	GL	SQ	F
Gêneros	7	9,486309	0,0001 *
Origem	1	1,664323	0,0001 *
Idade da planta	1	0,028990	0,3399 n.s.
Temperatura	1	2,030192	0,0001 *
Órgãos	1	0,009041	0,5940 n.s.
Partes	1	0,219276	0,0087 *
Meios	2	0,265472	0,0155 *
Gêneros x origem	7	6,149550	0,0001 *
Gêneros x idade da planta	7	0,609781	0,0079 *
Gêneros x temperatura	7	6,483343	0,0001*
Gêneros x órgãos	7	0,218487	0,4430 n.s.
Gêneros x partes	7	0,903098	0,0002 *
Gêneros x meios	14	0,437096	0,4696 n.s.
Idade x órgãos x partes	4	0,097809	0,5455 n.s.
Resíduo	2234	71,062639	
Total	2303	99,702973	

C.V. = 23,29%

Onde:

F.V. = fonte de variação

C.V. = coeficiente de variação

G.L. = graus de liberdade

S.Q. = soma dos quadrados

F = Teste de Snedecor

origem (campo ou casa de vegetação)

temperatura (28°C ou 37°C )

órgãos da planta (folha ou caule )

partes da planta ( parte inferior ou parte superior )

meios de cultura ( AA, BDA ou AFA )

\* = significância à 5%

n.s = não significativo

ANEXO 13 - REPRESENTAÇÃO DAS MÉDIAS COM OS RESPECTIVOS GÊNEROS DA SOJA DENTRO DA ORIGEM - CAMPO EM ORDEM DECRESCENTE, ASSIM COMO DA LETRA SÍMBOLO QUE REPRESENTA IGUALDADE DAS MESMAS.

Gêneros	Média	Significância
1 Dematiáceos	0,88890	A
3 <i>Fusarium</i> sp.	0,81446	B
7 <i>Mycelia sterilia</i>	0,80799	B
6 <i>Penicillium</i> sp.	0,74800	B C
5 <i>Aspergillus</i> sp.	0,73227	B C
4 <i>Acremonium</i> sp.	0,73227	B C
8 <i>Paecilomyces</i> sp.	0,71430	C
2 <i>Colletotrichum</i> sp.	0,71070	C

ANEXO 14 - REPRESENTAÇÃO DAS MÉDIAS COM OS RESPECTIVOS GÊNEROS DA SOJA DENTRO DA ORIGEM - CASA DE VEGETAÇÃO EM ORDEM DECRESCENTE, ASSIM COMO DA LETRA SÍMBOLO QUE REPRESENTA IGUALDADE DAS MESMAS.

Gêneros	Média	Significância
3 <i>Fusarium</i> sp.	0,77406	A
1 Dematiáceos	0,75991	A B
5 <i>Aspergillus</i> sp.	0,74912	A B C
7 <i>Mycelia sterilia</i>	0,74395	A B C
6 <i>Penicillium</i> sp.	0,73586	A B C
4 <i>Acremonium</i> sp.	0,71789	B C
2 <i>Colletotrichum</i> sp.	0,71789	B C
8 <i>Paecilomyces</i> sp.	0,71070	C

ANEXO 15 - REPRESENTAÇÃO DAS MÉDIAS COM OS RESPECTIVOS GÊNEROS DA SOJA DENTRO DA IDADE DA PLANTA - 20 DIAS EM ORDEM DECRESCENTE, ASSIM COMO DA LETRA SÍMBOLO QUE REPRESENTA IGUALDADE DAS MESMAS.

Gêneros	Média	Significância
1 Dematiáceos	0,94075	A
3 <i>Fusarium</i> sp.	0,80344	B
7 <i>Mycelia sterilia</i>	0,77676	B C
4 <i>Acremonium</i> sp.	0,72508	C
5 <i>Aspergillus</i> sp.	0,71430	C
8 <i>Paecilomyces</i> sp.	0,71430	C
2 <i>Colletotrichum</i> sp.	0,71070	C
6 <i>Penicillium</i> sp.	0,71070	C

ANEXO 16 - REPRESENTAÇÃO DAS MÉDIAS COM OS RESPECTIVOS GÊNEROS DA SOJA DENTRO DA IDADE DA PLANTA – 40 DIAS EM ORDEM DECRESCENTE, ASSIM COMO DA LETRA SÍMBOLO QUE REPRESENTA IGUALDADE DAS MESMAS.

Gêneros	Média	Significância
1 Dematiáceos	0,89858	A
3 <i>Fusarium</i> sp.	0,78508	B
7 <i>Mycelia sterilia</i>	0,77518	B C
6 <i>Penicillium</i> sp.	0,77317	B C
5 <i>Aspergillus</i> sp.	0,76710	B C
4 <i>Acremonium</i> sp.	0,72508	B C
2 <i>Colletotrichum</i> sp.	0,71789	B C
8 <i>Paecilomyces</i> sp.	0,71070	C

ANEXO 17 - REPRESENTAÇÃO DAS MÉDIAS COM OS RESPECTIVOS GÊNEROS DA SOJA DENTRO DA TEMPERATURA – 28°C EM ORDEM DECRESCENTE, ASSIM COMO DA LETRA SÍMBOLO QUE REPRESENTA IGUALDADE DAS MESMAS.

Gêneros	Média	Significância
1 Dematiáceos	1,08549	A
3 <i>Fusarium</i> sp.	0,83332	B
7 <i>Mycelia sterilia</i>	0,78867	B C
6 <i>Penicillium</i> sp.	0,75879	B C
5 <i>Aspergillus</i> sp.	0,74553	C
4 <i>Acremonium</i> sp.	0,71789	C
2 <i>Colletotrichum</i> sp.	0,71789	C
8 <i>Paecilomyces</i> sp.	0,71430	C

ANEXO 18 - REPRESENTAÇÃO DAS MÉDIAS COM OS RESPECTIVOS GÊNEROS DA SOJA DENTRO DA TEMPERATURA – 37°C EM ORDEM DECRESCENTE, ASSIM COMO DA LETRA SÍMBOLO QUE REPRESENTA IGUALDADE DAS MESMAS.

Gêneros	Média	Significância
7 <i>Mycelia sterilia</i>	0,76327	A
3 <i>Fusarium</i> sp.	0,75519	A B
1 Dematiáceos	0,75384	A B
5 <i>Aspergillus</i> sp.	0,73586	A B
4 <i>Acremonium</i> sp.	0,73227	A B
6 <i>Penicillium</i> sp.	0,72508	A B
2 <i>Colletotrichum</i> sp.	0,71070	B
8 <i>Paecilomyces</i> sp.	0,71070	B

ANEXO 19 - REPRESENTAÇÃO DAS MÉDIAS COM OS RESPECTIVOS GÊNEROS DA SOJA DENTRO DA PARTE INFERIOR DA PLANTA EM ORDEM DECRESCENTE, ASSIM COMO DA LETRA SÍMBOLO QUE REPRESENTA IGUALDADE DAS MESMAS.

Gêneros	Média	Significância
1 Dematiáceos	0,95281	A
3 <i>Fusarium</i> sp.	0,83939	B
7 <i>Mycelia sterilia</i>	0,79563	B C
5 <i>Aspergillus</i> sp.	0,73586	C D
4 <i>Acremonium</i> sp.	0,73227	C D
6 <i>Penicillium</i> sp.	0,72508	C D
2 <i>Colletotrichum</i> sp.	0,71070	D
8 <i>Paecilomyces</i> sp.	0,71070	D

ANEXO 20 - REPRESENTAÇÃO DAS MÉDIAS COM OS RESPECTIVOS GÊNEROS DA SOJA DENTRO DA PARTE SUPERIOR DA PLANTA EM ORDEM DECRESCENTE, ASSIM COMO DA LETRA SÍMBOLO QUE REPRESENTA IGUALDADE DAS MESMAS.

Gêneros	Média	Significância
1 Dematiáceos	0,88652	A
6 <i>Penicillium</i> sp.	0,75879	B
7 <i>Mycelia sterilia</i>	0,75631	B
3 <i>Fusarium</i> sp.	0,74912	B
5 <i>Aspergillus</i> sp.	0,74553	B
4 <i>Acremonium</i> sp.	0,71789	B
2 <i>Colletotrichum</i> sp.	0,71789	B
8 <i>Paecilomyces</i> sp.	0,71430	B