



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE BALSAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE

DAIANA SANTOS GOMES

**COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM
MILHO (*Zea mays* L.) VISANDO O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Spodoptera
frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Balsas

2022

DAIANA SANTOS GOMES

**COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM
MILHO (*Zea mays* L.) VISANDO O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Spodoptera
frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós –
Graduação em Agricultura e Ambiente da
Universidade Estadual do Maranhão, Centro de
Estudos Superiores de Balsas, como requisito
final para obtenção do grau de Mestre em
Agricultura e Ambiente.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Michela Costa
Batista

Coorientador: Prof. Dr. Richard Ian
Samuels

Balsas

2022

G633c

Gomes, Daiana Santos

Colonização endofítica de fungos entomopatogênicos em milho (*Zea mays* L.) visando o controle biológico de *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). / Daiana Santos Gomes. – Balsas, 2022.

63 f.

Monografia (Pós-Graduação) – Agricultura e Meio Ambiente, Universidade Estadual do Maranhão – UEMA / Balsas, 2022.

1. Controle Microbiano.
 2. Fungos Endofíticos.
 3. Virulência.
 4. Lagarta do Cartucho do Milho.
 5. Bio- Estimulador.
- I. Título.

CDU: 633.51

DAIANA SANTOS GOMES

**COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM
MILHO (*Zea mays* L.) VISANDO O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Spodoptera
frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós –
Graduação em Agricultura e Ambiente da
Universidade Estadual do Maranhão, Centro de
Estudos Superiores de Balsas, como requisito
final para obtenção do grau de Mestre em
Agricultura e Ambiente.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Michela Costa
Batista

Coorientador: Prof. Dr. Richard Ian
Samuels

Aprovada em: 27/julho/2022

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



MICHELA COSTA BATISTA

Data: 21/10/2022 14:11:39-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dra. Michela Costa Batista
Universidade Estadual do Maranhão
Orientadora

Documento assinado digitalmente



ADRIANO SOARES REGO

Data: 21/10/2022 18:05:28-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Adriano Soares Rêgo
Universidade Estadual do Maranhão

Documento assinado digitalmente



GERSON ADRIANO SILVA

Data: 26/09/2022 14:46:16-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Gerson Adriano Silva
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

*“Todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus”
(Rm 8, 28)*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me orienta e me dá forças para superar todos os obstáculos e com isso foi possível cada conquista, felicidade e aprendizado.

Aos meus pais, Adailton Costa Gomes e Justiniana Coelho de Sousa Santos e minha irmã Débora Santos Gomes, meus maiores exemplos de força e sabedoria, coragem e persistência, que me apoiaram e estiveram sempre presentes em todos os momentos em que mais precisei e por todo cuidado e amor.

Ao meu noivo Vinicius Schwaab Ciappina, por todo amor, paciência, cuidado, dedicação, por toda força e companheirismo e por sempre acreditar em mim e lutar junto comigo para realizar meus sonhos.

À minha amiga Ana Carolina Loreti Silva, por toda paciência, carinho, companheirismo, por todo auxílio com a pesquisa e com as estatísticas. Sou muito grata a Deus por ter ganhado de presente sua amizade.

A minhas amigas e companheiras de todos os momentos Rayane Moreira, Aline Mascarenhas e Kalyne Sousa que esteve sempre ao meu lado desde o início dessa jornada. Serei sempre grata a Deus pela amizade que conquistei.

Aos grandes amigos que fiz no laboratório, os quais compartilharam conhecimentos e ensinamentos diários, especialmente à Professora Dr.^a Antônia Alice, professora Dr.^a Raimunda Lemos, professor Dr. Adriano Soares Rêgo por todo apoio que me deste do início ao fim dessa jornada árdua.

À minha orientadora professora Dr.^a Michela Costa Batista e meu coorientador professor Dr. Richard Ian Samuels por toda orientação, amizade, companheirismo, carinho e conhecimento. Vocês foram fonte de muita sabedoria para mim, me ensinaram a dar meus primeiros passos na vida científica. São pesquisadores que admiro muito.

À Universidade Estadual do Maranhão, ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente e ao Laboratório de Entomologia e Fitopatologia situado no campus da UEMA de São Luís, pela oportunidade de realização deste curso.

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela parceria e por me conceder os isolados fúngicos para realização da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa.

Agradeço a todos que me acolheram em São Luís e que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Com a crescente necessidade de uma produção agrícola mais sustentável e a redução da dependência de agrotóxicos, surge a necessidade de aprimorar as técnicas de controle biológico e sua efetiva aplicação. Assim, a aplicação de fungos na forma endofítica é uma técnica promissora. Portanto, o presente trabalho teve como Selecionar isolados de fungos entomopatogênicos com elevada virulência para controle biológico de *S. frugiperda* via colonização endofítica de plantas de milho Dois isolados de *Beauveria bassiana* (LPP 129 e LPP SP1) e dois isolados de *Metarhizium anisopliae* (ESALQ 818 e LPP M1) foram testados quanto à virulência contra larvas de *S. frugiperda* via contato. Plantas de milho foram então inoculadas com conídios fúngicos por meio de pulverização foliar e a presença dos fungos em diferentes tecidos vegetais foi avaliada 7, 14, 21, 28 e 90 dias após a inoculação. Após confirmação da colonização endofítica nos tecidos foliares, folhas de milho foram oferecidas para *S. frugiperda* de terceiro ínstar e a sobrevivência foi monitorada por 10 dias. Parâmetros agronômicos relacionados ao crescimento das plantas também foram avaliados. Os resultados mostraram variabilidade na virulência dos quatro isolados contra larvas de *S. frugiperda*, em que o isolado LPPM1 foi considerado de baixa virulência, LPP 129 virulência mediana e ambos ESALQ 818 e LPP SP1 foram altamente virulentos, matando >90% das larvas em 5-6 dias. Os dois isolados mais virulentos foram utilizados para inoculação via pulverização foliar em plantas de milho. A colonização endofítica de plantas com ESALQ 818 e LPP SP1 foi eficiente em reduzir a sobrevivência de larvas de *S. frugiperda* que se alimentaram de folhas. Larvas expostas a folhas de milho colonizadas pelo fungo apresentaram sobrevivência média de 3 dias (S50), e mortalidade de 96% no 7º dia de avaliação. O grupo controle teve uma sobrevivência de aproximadamente 90%. Quanto aos parâmetros agronômicos avaliados, foram observados aumentos significativos nas variáveis comprimento da raiz, diâmetro do caule, altura da planta, área foliar e número de folhas. dias após a inoculação. Plantas colonizadas com fungos na forma endofítica mostraram-se eficientes e virulentas contra larvas de *S. frugiperda*, além de causar efeitos positivos no crescimento vegetal, indicando o potencial da colonização endofítica para estratégias de controle biológico.

Palavras chave: Controle microbiano, fungos endofíticos, virulência, lagarta-do-cartucho-do-milho, bio-estimulador.

ABSTRACT

With the growing demand for more sustainable agricultural production and reduced dependence on pesticides, there is a need to improve biological control techniques and their effective application. Thus, the application of fungi in the endophytic form is a promising technique. Therefore, the present work aimed to select isolates of entomopathogenic fungi with high virulence against *Spodoptera frugiperda*, a key pest of corn, aiming to control this pest via endophytic colonization of plants with these fungi. Two *Beauveria bassiana* isolates (LPP 129 and LPP SP1) and two *Metarhizium anisopliae* isolates (ESALQ 818 and LPP M1) were tested for virulence against *S. frugiperda* larvae via contact. Corn plants were then inoculated with fungal conidia through foliar spraying and the presence of the fungi in different plant tissues was evaluated 7, 14, 21, 28 and 90 days after inoculation. After confirmation of endophytic colonization in leaf tissues, corn leaves were offered to third instar *S. frugiperda* and survival was monitored over 10 days. Agronomic parameters related to plant growth were also evaluated. The results showed variability in virulence of the four isolates against *S. frugiperda* larvae, in which isolate LPPM1 was considered to have low virulence, LPP 129 median virulence and both ESALQ 818 and LPP SP1 were highly virulent, killing >90% of the larvae in 5-6 days. The two most virulent isolates were used for inoculation via foliar spraying in maize plants. Endophytic colonization of plants with ESALQ 818 and LPPSP1 was efficient in reducing the survival of *S. frugiperda* larvae that had fed on leaves. The treatments differed significantly ($P < 0.0001$) from the control group. Larvae exposed to corn leaves colonized with the fungi showed a mean survival of 3 days (S_{50}), and 96% mortality on the 7th day of evaluation. The control group had a survival rate of approximately 90%. As for the agronomic parameters evaluated, significant increases were observed in the variables root length, stem diameter, plant height, leaf area and number of leaves. LPPSP1 and ESALQ 818 efficiently colonized maize plants via foliar inoculation, and was detected for up to 90 days after inoculation. Plants colonized with fungi in the endophytic form proved to be efficient and virulent against *S. frugiperda* larvae, as well as causing positive effects on plant growth, indicating the potential of endophytic colonization for biological control strategies.

Keywords: microbial control, endophytic fungi, fall armyworm, virulence.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Execução do experimento de inoculação dos fungos endofíticos em plantas de milho, via pulverização foliar. A) Semente em meio de cultura, evidenciando a eficiência do método de limpeza das sementes. B) Plantas de milho com 3 semanas de idade em casa de vegetação, prontas para inoculação. C) Proteção de substrato para aplicação da suspensão de conídios. D) Plantas de milho envoltas em saco plásticos, após serem inoculadas. **24**
- Figura 2.** Avaliação do estabelecimento dos fungos nas plantas, após a inoculação. A) Coleta de cinco plantas aleatórias para posterior limpeza com água corrente e secção das partes. B) Partes das plantas seccionadas que foram avaliadas quanto a presença dos fungos. C) Placa de Petri com meio de cultura SDA, com seis pedaços de raiz. D) com seis pedaços de caule. E) com seis pedaços de folha. **25**
- Figura 3.** Curvas de sobrevivência de larvas de *S. frugiperda* após exposição a conídios de *M. anisopliae* ESALQ 818; LPPM1; *B. bassiana* LPP 129; LPPSP1. Os resultados foram as médias de quatro repetições por isolado. Oitenta insetos foram utilizados por isolado. As larvas do grupo controle foram tratadas apenas com Tween 80 (0,01% v / v). Barras de erro padrão (SE). **27**
- Figura 4.** Resultados do bioensaio de virulência, confirmando conidiogênese dos isolados em larvas de 3º instar. A) Conidiogênese após a morte de larvas de *S. frugiperda* colonizadas pelo isolado *B. bassiana* LPP 129. B) Conidiogênese do isolado *M. anisopliae* ESALQ 818. C) Conidiogênese do isolado *B. bassiana* LPP SP1. D) Conidiogênese do isolado *M. anisopliae* LPP M1. **28**
- Figura 5.** A) e B) Deformações em pupas de *Spodoptera frugiperda* provenientes de larvas inoculadas com conídios fúngicos do isolado *B. bassiana* LPP129. C) adulto deformado e D) pupa de *Spodoptera frugiperda* que não completou ecdise. **29**
- Figura 6.** Resultado da inoculação dos isolados ESALQ 818 e LPP SP1, via pulverização foliar em plantas de milho, evidenciando o crescimento dos fungos dos tecidos das plantas. A), B) e C) Fungo *B. bassiana* LPP SP1 crescendo de tecidos foliares. D) Fungo *M. anisopliae* ESALQ 818 crescendo de raiz. E) Fungo *M. anisopliae* ESALQ 818 crescendo de caule. F) Fungo *M. anisopliae* ESALQ 818 crescendo de folhas de milho. **31**
- Figura 7.** Porcentagem de colonização de *M. anisopliae* ESALQ 818 em raiz de plantas de milho, ao longo do tempo em dias após a inoculação (7, 14, 21, 28 e 90 dias). Barras de erro padrão (SE). O fungo não foi detectado nos tempos 14, 21, 28 e 90 dias. **32**
- Figura 8.** Porcentagem de colonização de *B. bassiana* LPP SP1, em raiz de plantas de milho, ao longo do tempo em dias após a inoculação (7, 14, 21, 28 e 90 dias). Barras de erro padrão (SE). Não houve diferença estatística entre os dias de avaliação. **33**

- Figura 9.** Porcentagem de colonização de *M. anisopliae* ESALQ 818 em caule de plantas de milho, ao longo do tempo em dias após a inoculação (7, 14, 21, 28 e 90 dias). Barras de erro padrão (SE). Não houve diferença significativa entre os dias de avaliação. **34**
- Figura 10.** Porcentagem de colonização de *B. bassiana* LPP SP1, em caule de plantas de milho, ao longo do tempo em dias após a inoculação (7, 14, 21, 28 e 90 dias). Barras de erro padrão (SE). Não houve diferença significativa entre os dias de avaliação. **34**
- Figura 11.** Porcentagem de colonização de *M. anisopliae* ESALQ 818 em folhas de plantas de milho, ao longo do tempo em dias após a inoculação (7, 14, 21, 28 e 90 dias). Barras de erro padrão (SE). Não houve diferença significativa entre os dias de avaliação. **36**
- Figura 12.** Porcentagem de colonização de *B. bassiana* LPP SP1, em folhas de plantas de milho, ao longo do tempo em dias após a inoculação (7, 14, 21, 28 e 90 dias). Barras de erro padrão (SE). Médias seguidas por letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, da presença do fungo na folha ao longo do tempo. **36**
- Figura 13.** Dados agronômicos de plantas de milho, aos 15 dias após a inoculação. A) Área foliar. B) altura de planta. C) comprimento da raiz. D) diâmetro de caule. Barra de erro padrão (SE). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. **39**
- Figura 14.** Dados agronômicos de plantas de milho aos 30 dias após a inoculação. A) Área foliar. B) altura de planta. C) comprimento da raiz. D) diâmetro de caule. Barra de erro padrão (SE). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. **40**
- Figura 15.** Dados agronômicos de plantas de milho, aos 90 dias após a inoculação. A) Área foliar. B) altura de planta. C) comprimento da raiz. D) diâmetro de caule. Barra de erro padrão (SE). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. **42**
- Figura 16.** Sobrevivência de larvas de *S. frugiperda* oferecidas folhas de milho colonizadas endofiticamente por *M. anisopliae* ESALQ 818 e *B. bassiana* LPPSP1. As plantas controles foram tratadas com somente Tween 80 (0,01%). **45**
- Figura 17.** Virulência do fungo endofítico presente nas folhas quando oferecidas a lagartas de *S. frugiperda*. A) Lagarta sadia se alimentando com folha inoculada com fungo endofítico. B) Lagarta apresentando sintomas de infecção do fungo, após consumo de folha colonizada com fungo endofítico. **46**

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Cultura do milho	13
2.2	<i>Spodoptera frugiperda</i>	14
2.3	Controle microbiano	15
2.4	Fungos entomopatogênicos, a relação endofítica com plantas e seu potencial no controle de pragas	17
3	HIPÓTESE E OBJETIVOS	20
3.1	Hipótese do trabalho	20
3.2	Objetivo geral	20
3.3	Objetivos específicos	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	Seleção de fungos entomopatogênicos e produção de conídios	21
4.2	Obtenção e criação de <i>Spodoptera frugiperda</i>	22
4.3	Bioensaio de virulência fúngica utilizando isolados de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> contra larvas de <i>S. frugiperda</i>	22
4.4	Inoculação dos fungos e determinação da colonização endofítica em plantas de milho	23
4.5	Avaliação dos parâmetros agronômicos	26
4.6	Sobrevivência de larvas de <i>S. frugiperda</i> expostas a plantas de milho colonizadas endofiticamente com <i>M. anisopliae</i> ou <i>B. bassiana</i>	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1	Bioensaio de virulência fúngica via contato direto com conídios dos isolados de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i>	27
5.2	Inoculação dos fungos e determinação da colonização endofítica em plantas de milho	31
5.3	Avaliação dos parâmetros agronômicos	38
5.4	Sobrevivência de larvas de <i>S. frugiperda</i> expostas a plantas de milho colonizadas endofiticamente com <i>M. anisopliae</i> ou <i>B. bassiana</i>	43
6	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

A lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma praga que está amplamente distribuída em regiões subtropicais e tropicais (AHMADA et al., 2019). Este inseto causa danos a várias culturas de importância econômica tais como: gramíneas forrageiras, algodão, amendoim e soja, porém, tem preferência pelo milho (VIRLA et al., 2008). As injúrias causadas pela *S. frugiperda* na cultura do milho vão desde a emergência até o pendoamento e espigamento, podendo ocasionar perdas de produtividade de até 70%, se o ataque ocorrer nos estágios iniciais da planta (HRUSKA, 2019).

Apesar da tecnologia de milho transgênico expressando a toxina de *Bacillus thuringiensis* Berliner (milho Bt) ser amplamente difundida no Brasil, o método mais empregado para reduzir populações de *S. frugiperda* ainda é o controle químico (AGROFIT, 2015). Entretanto, os efeitos negativos ao ambiente, e o fato de que as lagartas de *S. frugiperda* se alimentam no cartucho da planta, reduz o contato com inseticidas aplicados, diminuindo a eficiência de tais produtos, incentivando a busca por métodos alternativos de controle (BACCI et al., 2019). Nesse sentido, o controle biológico por meio de microrganismos entomopatogênicos, como *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok (Hypocreales: Cordycipitaceae, Clavicipitaceae) pode ser uma alternativa eficaz no controle de *S. frugiperda* (BUENO et al., 2017; GUO et al., 2020).

O controle biológico por meio de microrganismos entomopatogênicos é uma estratégia de manejo de pragas conhecida como controle microbiano, e consiste na utilização de entomopatógenos, como os fungos, aplicados via pulverização (LACEY et al., 2015). Fungos podem ser agentes de controle biológico eficazes, uma vez que são capazes de penetrar através da cutícula do inseto, aumentar o potencial para epizootias e as taxas de mortalidade nas populações de pragas, mantendo tais populações em equilíbrio (GONZALEZ et al., 2016). Entretanto, a eficácia dos fungos entomopatogênicos, pode ser limitada por fatores abióticos, como a exposição à radiação ultravioleta (UV), temperatura alta e umidade baixa, que reduzem a viabilidade dos conídios fúngicos e, portanto, seu grau de virulência (JABER et al., 2018; MAINA et al., 2018).

Considerando maneiras alternativas, inovadoras e promissoras para proteger fungos entomopatogênicos de condições adversas, um método alternativo de aplicação é inocular as plantas com fungos. Assim, os fungos se estabelecem como endófitos, em que as plantas protegem esses microrganismos contra fatores abióticos e, conseqüentemente, os mesmos fornecem à planta proteção contra pragas, fitopatógenos e ainda estimulam seu crescimento

(GREENFIELD et al., 2016; VEGA 2018; BRANINE et al., 2019). Os fungos endofíticos são definidos como fungos que colonizam tecidos internos da planta, sem causar danos (PETRINI, 1991; WILSON, 1995; HYDE et al., 2008).

Vários gêneros de fungos entomopatogênicos podem estabelecer uma relação endofítica com a planta, trazendo diversas vantagens para a mesma (JABER et al., 2016; MC KINNON et al., 2017). Um exemplo, são os fungos dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* que foram capazes de colonizar plantas de milho, promovendo o crescimento das plantas e controle biológico de *S. frugiperda* de acordo com estudos realizados por Ahmada et al., (2020); Mahmood et al., (2019); Ramos et al., (2020) e Russo et al., (2020).

De acordo com as problemáticas citadas acima, é evidente que o uso de fungos endofíticos pode ser a base de uma estratégia de controle biológico contra pragas específicas, que vivem oclusas na planta. Como é o caso de *S. frugiperda* que ao permanecer no cartucho do milho, reduz a exposição da praga a inseticidas sintéticos e outros métodos de controle aplicados por meio de pulverização (RESQUÍN-ROMERO et al., 2016).

Neste sentido, estudos que subsidiem a implantação de técnicas que avaliem o potencial de microrganismos entomopatogênicos, tais como os fungos e a avaliação de estratégias de inoculação endofítica desses organismos a fim de aumentar a eficácia no controle de pragas de milho, podem trazer resultados promissores. O presente estudo teve como objetivo selecionar isolados de fungos entomopatogênicos com elevada virulência contra *S. frugiperda*, praga-chave da cultura do milho, visando o controle biológico na forma endofítica depois da colonização das plantas com os fungos. Para isso, foi importante primeiramente avaliar diferentes isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* para identificar os isolados mais virulentos a *S. frugiperda* bem como o potencial de colonização de plantas de milho, tornando-se endofíticos. Portanto, foram avaliados os efeitos dos fungos sobre a sobrevivência de *S. frugiperda*, em fase larval exposta a folhas colonizada com fungos endofíticos, assim como os parâmetros agrônômicos relacionados ao crescimento das plantas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura do Milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie pertencente à família Poaceae, oriundo da América Central, com grande importância econômica e é cultivado em muitas partes do mundo, devido a sua grande adaptabilidade, que permite o seu cultivo em climas tropicais, subtropicais e temperados (BARROS et al., 2014).

No decorrer das últimas décadas, o milho alcançou o patamar de maior cultura agrícola do mundo, com mais de 1 bilhão de toneladas produzidas, ultrapassando a produção do arroz e do trigo (ARTUZO et al., 2018). Na safra 2021/22, a produção mundial de milho foi de 1.19 bilhões de toneladas, tendo destaque para os Estados Unidos, com 380 milhões, e China com 268 milhões, seguidos do Brasil, em terceiro lugar, com 114 milhões (USDA, 2022). No Brasil, o Centro-Oeste foi a região com a maior produção do país, com 63.173 mil toneladas e as Regiões Norte/Nordeste seguiram em quarto lugar produzindo 10.930 mil toneladas tendo o Estado do Maranhão liderando a produção com 1.979,9 mil toneladas (CONAB, 2022).

A cultura do milho tem grande importância econômica pelo valor nutricional dos grãos, que são usados tanto na alimentação humana como na alimentação animal. De fato, a maior parte da produção desse cereal no mundo, cerca de 70%, se destina ao consumo animal (GALVÃO et al., 2014). No Brasil, entre 60 a 80% da produção de milho é utilizada na composição de silagem e rações, sendo a principal fonte de energia na dieta de rebanhos bovinos, caprinos, ovinos e na avicultura (DUARTE et al., 2015; SARAIVA et al., 2020).

É notório que a produção de milho evoluiu significativamente no Brasil nos últimos anos, proporcionando uma alta lucratividade, contudo, a produtividade ainda é afetada em várias regiões devido a muitas áreas serem cultivadas continuamente, não adotando rotação de culturas o que favorece a ocorrência de pragas (DUARTE et al., 2015). Dentre as principais pragas que atacam o milho, *S. frugiperda* é considerada a mais importante, devido aos enormes danos causados às lavouras, pela grande frequência de ocorrência e pela dificuldade de seu controle a partir de métodos convencionais (BARCELOS et al., 2018). Essa praga pode ocasionar perdas de produtividade de até 70%, se a infestação ocorrer nos estágios iniciais da planta (HRUSKA, 2019).

2.2 *Spodoptera frugiperda*

Conhecida como lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda* (SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é considerada a principal praga da cultura do milho, devido aos danos consideráveis causado às lavouras, a alta frequência de ocorrência e a dificuldade de controle populacional por métodos convencionais (MORAES et al., 2015; BARCELOS et al., 2018). A lagarta-do-cartucho é considerada uma espécie altamente polífaga e cosmopolita, atingindo diversas lavouras no mundo inteiro (DAY et al., 2017). Apresenta alta capacidade de dispersão e grande voracidade por suas plantas hospedeiras, entre elas algodão, arroz, alfafa, amendoim, batata, couve, soja, feijão, repolho, sorgo, trigo e tomate (GUO et al., 2020).

Spodoptera frugiperda é classificada como holometabólica, isto é, compreende as fases de ovo, larva, pupa e adulto (SARMENTO et al., 2002). O inseto adulto é uma mariposa com aproximadamente 3,5 cm de comprimento, coloração pardo-escuro nas asas anteriores e branco-acinzentada nas posteriores, com longevidade entre 10 a 12 dias (GALLO et al., 2002). As fêmeas adultas ovipositam na parte superior da folha, e o número de ovos pode variar de 1500 a 2000 por postura, com tempo para eclosão entre três a cinco dias. As larvas recém eclodidas se alimentam de folhas novas, raspando-as. A fase larval de *S. frugiperda* passa por sete instares, com duração total entre 14 e 22 dias. Durante essa fase, as lagartas podem atacar também a base da espiga ou grãos leitosos. No fim da fase larval, as lagartas penetram o solo onde se transformam em pupas, permanecendo neste estágio por cerca de oito a 13 dias (SARMENTO et al., 2002; GALLO et al., 2002).

As injúrias causadas pela *S. frugiperda* na cultura do milho vão desde a emergência até o pendoamento e espigamento, podendo ocasionar perdas de produtividade de até 70%, se o ataque ocorrer nos estágios iniciais da planta (HRUSKA, 2019). Após o estabelecimento, a praga permanece ocasionando danos até o final do ciclo da cultura podendo reduzir em até 20% a produção do milho apenas pelos danos foliares (GALLO et al., 2002). Após a formação do cartucho, a lagarta se abriga em seu interior dificultando as medidas de controle, principalmente o químico, provocando grandes prejuízos quando não manejada (BARCELOS et al., 2018).

As preocupações com infestações de *S. frugiperda* não se devem somente aos danos provocados nas plantas, mas especialmente à dificuldade de seu controle. Além da ineficiência do controle de *S. frugiperda* por meio de produtos químicos pulverizados, quando a lagarta se encontra abrigada no cartucho, esse inseto apresenta uma alta resistência a diversos produtos (BACCI et al., 2019). Adicionalmente, o uso inadequado de inseticidas pode levar a eliminação e/ou redução de diversas espécies de inimigos naturais que ocorrem nas áreas cultivadas e

adjacências, gerando problemas de ressurgência da praga-chave, e aumento nas populações de pragas secundárias causando danos significativos (FAGGION, 2017), além de representar riscos à saúde dos agricultores e consumidores, contaminar o meio ambiente (KEBEDE et al., 2018). Assim, a alta resistência da praga aos produtos utilizados e a eliminação de inimigos naturais têm sido apontados como os principais responsáveis pelo aumento de ataque e severidade dos danos causados por *S. frugiperda* (DAY et al., 2017; KEBEDE et al., 2018).

Diante da ineficiência do controle químico e dos problemas gerados pelo seu uso, surgiram vários métodos de controle alternativos, como os organismos transgênicos, que no caso do milho, contém genes da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (ANGELO et al., 2010) conferindo resistência a planta a algumas espécies de lepidópteros, entre eles *S. frugiperda* (SILVA et al., 2019). Entretanto, os agricultores acabam cultivando o milho Bt durante o ano inteiro sem adoção de áreas de refúgio adequadas (FARIAS et al., 2016). E esse fator implica em um aumento na pressão de seleção em *S. frugiperda*, contribuindo para o surgimento de populações de lagartas resistentes a toxinas Bt (FARIAS et al., 2016, BERNARDI et al., 2017). Portanto, para amenizar o impacto da utilização exagerada de inseticidas químicos e minimizar o desenvolvimento de resistência sobre a tecnologia Bt devido ao seu uso não recomendado, a aplicação de inseticidas biológicos é considerada uma das estratégias adotadas no Manejo Integrado de Pragas (MIP), uma metodologia de manejo que busca adotar técnicas sustentáveis para prevenção de pragas e doenças na lavoura (SOUZA et al., 2019).

2.3 Controle microbiano

Diante das implicações do uso do controle químico e da redução da eficiência do milho Bt para o controle de *S. frugiperda*, torna-se fundamental a busca por novos métodos de manejo de alta eficiência e, preferencialmente, com reduzido impacto adverso ao meio ambiente (BUENO et al., 2017; GUO et al., 2020; GOULART et al., 2011, LOUREIRO et al., 2020). Para amenizar o impacto da utilização exacerbada de inseticidas químicos, uma das estratégias adotadas no MIP é a utilização de agentes de controle biológico (LOPES et al., 2018, DIAS et al., 2019).

O controle biológico é definido como o uso de organismos vivos para reduzir a população de outro organismo, considerado praga (VAN LETEREN et al., 2018). Dentre os métodos de controle biológico, um dos mais aceitos pelos produtores é o controle biológico aumentativo (PARRA, 2014). Nesse tipo de controle, os inimigos naturais, incluindo os fungos

entomopatogênicos, são criados em massa para liberação em grande número no campo, tanto para obter controle imediato de pragas, quanto para controle durante várias gerações (PARNELL et al., 2016). Os fungos entomopatogênicos são capazes de colonizar insetos destruindo os tecidos e causando a morte (LACEY et al., 2015). A mortalidade de insetos suscetíveis a esses fungos ocorre devido à capacidade dos conídios fúngicos de se aderir, germinar, crescer e penetrar a cutícula do hospedeiro, utilizando-o como fonte de nutrientes para a produção de conídios no cadáver do hospedeiro (ORTIZ-URQUIZA et al., 2016; HORTA et al., 2017).

Deste modo, o uso de fungos entomopatogênicos pode diminuir o uso do controle químico, devido a sua especificidade, facilidade de manipulação e por não induzirem o desenvolvimento de resistência (SAFAVI et al., 2017). Além de estabelecerem-se permanentemente no solo devido a sua capacidade de produzir inóculo sobre insetos mortos, possuem a capacidade de penetração através do tegumento dos insetos (EL-GHANY et al., 2015). Portanto, tornando-os agentes de controle de pragas eficazes, além de existir tecnologias para sua produção e formas de aplicação semelhantes aos inseticidas químicos (GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2010).

Os agentes de controle microbiano são os organismos mais utilizados no controle biológico aumentativo e são produzidos por aproximadamente 200 fabricantes, mundialmente (DUNHAM, 2015). Há cerca de 209 cepas microbianas de 94 espécies diferentes disponíveis comercialmente para controle de pragas (GUO et al., 2020). Mundialmente, a América do Norte possui o maior mercado de biopesticidas, seguida pela Europa (RESEARCH AND MARKETS, 2016). No Brasil e no mundo, *M. anisopliae* e *B. bassiana* são as espécies com maior número de registros de produtos (MOURA et al., 2019), além de ser os entomopatógenos mais comercializados por empresas e produzido em larga escala (PARRA, 2014).

Os gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* são dois grupos de fungos entomopatogênicos importantes, bem conhecidos mundialmente por possuir uma ampla gama de hospedeiros, incluindo *S. frugiperda* (BUTT et al., 2016; LACEY et al., 2015; ERLER et al., 2015). Esta importância se dá pela capacidade de evitar as respostas imunes do inseto, seu modo de ação por contato, e atributos importantes que facilitam a produção em massa em nível industrial, como o rápido crescimento *in vitro* em diferentes meios de cultura (HASEEB et al., 2014). Dentre os agentes de controle biológico, os fungos entomopatogênicos como *Metarhizium rileyi*, *M. anisopliae* e *B. bassiana* vêm se destacando-se no controle de lepidópteros-praga, principalmente sobre lagartas da família Noctuidae (COSTA et al., 2015; FRONZA et al., 2017; GUO et al., 2020).

Muitos trabalhos vêm sendo realizados com isolados de *Metarhizium* e *Beauveria* no controle do complexo de lagarta do gênero *Spodoptera*. Nesse sentido, experimentos de campo realizados por Mallapur et al., (2018), na Índia, com *M. rileyi* sobre milho, relataram uma redução de 58,9 a 62,9% na população da lagarta *S. frugiperda*. Cruz-Avalos et al., (2019), avaliando a virulência de três cepas de *M. anisopliae*, constatou que houve uma mortalidade de 100% dos ovos e larvas de *S. frugiperda*. Akutse et al., (2019), testando vinte isolados diferentes de *Beauveria* e *Metarhizium* contra ovos e larvas de segundo instar de *S. frugiperda*, constatou que os isolados *M. anisopliae* ICIPE 78 causou mortalidade de 87%, e isolado *M. anisopliae* ICIPE 41 causou 96,5% mortalidade em larvas de *S. frugiperda*.

Embora os fungos sejam importantes no controle de pragas, é importante observar que a eficácia desses microrganismos, pode ser limitada por fatores abióticos, como a radiação ultravioleta (UV), temperaturas extremas e umidade baixa, que reduzem a viabilidade dos conídios fúngicos (MICHEREFF FILHO et al., 2009; MAINA et al., 2018). Assim, considerando maneiras alternativas e promissoras para proteger os fungos entomopatogênicos de condições adversas quando liberados no campo, um método alternativo de aplicação é inocular as plantas com os fungos, quais podem se estabelecer como endófitos. Desse modo o fungo fica protegido contra fatores abióticos, enquanto pode fornecer à planta proteção contra pragas, diminuindo o volume de inóculo necessário para o controle da praga (GREENFIELD et al., 2016; VEGA, 2018; BRANINE et al., 2019).

2.4 Fungos entomopatogênicos, relação endofítica com plantas e potencial no controle de pragas

Fungos endófitos são definidos como fungos que colonizam tecidos internos da planta, vivendo ali por todo ou parte do seu ciclo de vida, sem causar sintomas aparentes ou danos aos tecidos da planta (PETRINI, 1991; WILSON, 1995; HYDE et al., 2008). A colonização por endófitos fúngicos pode ocorrer de forma sistêmica, pela penetração e disseminação na planta levando à colonização do apoplasto (QUESADA- MORAGA et al., 2016). Os endófitos fúngicos podem ser encontrados em todas as partes da planta, incluindo o xilema e floema (ARUN et al., 2015).

Os microrganismos endofíticos têm recebido grande atenção como uma alternativa ao controle químico de pragas (ULRICH et al., 2008). Isso porque, a planta hospedeira fornece nutrientes para os microrganismos endofíticos, enquanto estes podem produzir substâncias que

ajudam a proteger a planta do ataque de outros microrganismos ou insetos (ALURAPPA et al., 2018).

Diversos sistemas de defesa das plantas evoluíram para combater ataque de pragas, em processos que envolvem principalmente a produção de compostos tóxicos que inibem o desempenho dos insetos (MCCORMICK et al., 2016; ALLEGRUCCI et al., 2018). De acordo com Martinez-Medina et al. (2016), após exposição a patógenos, insetos ou estresse, plantas colonizadas com fungos endofíticos mostram indução mais rápida de várias células de defesa em comparação com plantas não colonizadas. Além da indução de resistência nas plantas, os fungos endofíticos também atuam infectando o inseto que se alimenta da planta hospedeira, levando a epizootias que reduzem a população (MC KINNON et al., 2017).

Apesar dos fungos entomopatogênicos serem estudados por muitos anos, sua eficácia em campo e adoção comercial é limitada pela suscetibilidade a radiação solar e baixa umidade, além de problemas com aplicação em campo, não atingindo a praga alvo e ausência de análise de custo/ benefício (VEGA et al., 2018). Assim, a utilização dos fungos na forma endofítica na agricultura como base de uma estratégia de controle biológico contra espécies pragas específicas, especialmente aquelas que possuem comportamentos que reduzem a exposição a inseticidas sintéticos e outros métodos de controle, pode ser bastante vantajoso (RESQUÍN-ROMERO et al., 2016).

Vários gêneros de fungos entomopatogênicos atuam como endofíticos de variadas espécies de plantas, e entre os benefícios dessa interação, os fungos podem persistir no solo por longos períodos de tempo (MEDO et al., 2011) e desenvolver associações com as raízes das plantas, ocasionando benefícios no crescimento da planta (LOPEZ et al., 2015; JABER et al., 2016), na aquisição de nutrientes (BEHIE, et al., 2014; SONG, 2015), proteção contra fitopatógenos (JABER, 2015), herbivoria (PARSA et al., 2013) e estresse abiótico (KHAN et al., 2012).

A introdução de fungos nas plantas pode ocorrer de forma artificial pela pulverização foliar, inoculação de sementes e encharcamento de solo (RUSSO, 2019). Experimentos de colonização das plantas com fungos endofíticos têm demonstrado resultados promissores, como os estudos de Ramos et al., (2020) em que utilizou o método de encharcamento de solo com conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, no qual se estabeleceram como endofíticos em partes de plantas de milho e resultou no controle de *S. frugiperda* em quarto instar larval causando até 87% de mortalidade. Outro estudo promissor foi de Russo et al., (2020), no qual verificaram que *B. bassiana* colonizou 100%, 80% e 60% das folhas, caules e raízes de plantas de milho respectivamente, após a pulverização foliar, consequentemente causando mortalidade de *S.*

frugiperda. Por último, Ahmada et al., (2020) inoculando sementes de milho com esporos de *Metarhizium robertsii*, ao avaliar a planta no estágio V4, observou que o fungo colonizou 91% das plantas, e as plantas colonizadas apresentaram-se maiores, com alteração na expressão do gene de defesa na via de biossíntese de ácido jasmônico (JA *lox1* e *opr7*), além de suprimir a taxa de crescimento da lagarta *Agrotis ipsilon* (Hufnagel).

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese do trabalho

Fungos entomopatogênicos são capazes de colonizar plantas de milho como endofíticos, promover o controle microbiano da lagarta-do-cartucho-do-milho *S. frugiperda* bem como estimular o crescimento de plantas de milho.

3.2 Objetivo geral

Selecionar isolados de fungos entomopatogênicos com elevada virulência para controle biológico de *S. frugiperda* via colonização endofítica de plantas de milho. **3.3 Objetivos específicos**

- a. Testar a virulência de dois isolados de *M. anisopliae* (ESALQ 818 e LPP M1) e de *B. bassiana* (LPP 129 e LPPSP1) sobre *S. frugiperda* e determinar os isolados ‘mais aptos a colonizar plantas de milho endofiticamente;
- b. Avaliar a metodologia de inoculação dos isolados fúngicos selecionados na forma endofítica em plantas de milho e a permanência dos fungos em diferentes tecidos da planta;
- c. Avaliar a sobrevivência de larvas de *S. frugiperda* expostas aos isolados fúngicos selecionados na forma endofítica;
- d. Avaliar parâmetros agrônômicos das plantas de milho inoculadas com fungos na forma endofítica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Entomologia e Fitopatologia e em casa de vegetação localizados na Cidade Universitária Paulo VI, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Campus de São Luís, Maranhão (Latitude: -2.53073; longitude: 44.3068; 2° 31' 51" Sul, 44° 18' 24" Oeste). A classificação climática da região segundo Koppen-Geiger: é tropical (Am) com uma época seca. A temperatura média da região é de 26,8 °C e pluviosidade média anual de 2.156 mm.

4.1 Seleção de fungos entomopatogênicos e produção de conídios

Foram obtidos dois isolados de *M. anisopliae* (ESALQ 818 e LPP M1) e de *B. bassiana* (LPP 129 e LPPSP1) da coleção mantida pelo Laboratório de Entomologia e Fitopatologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) para serem utilizados nos bioensaios. O isolado ESALQ 818 foi coletado de amostras de solo oriundas do município de Piracicaba, São Paulo. O isolado LPP M1 foi encontrado infectando *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). O isolado LPP 129 de *M. anisopliae* foi coletado de amostras de solo, do Estado de Rondônia e o LPP SP1 foi encontrado infectando adulto da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) no município de Bom Jardim, Rio de Janeiro.

Para a produção dos fungos, os conídios dos isolados foram semeados em placas de Petri esterilizadas contendo meio de cultura sólido (SDA) (4g de dextrose; 1g de peptona; 1g de extrato de levedura; 8g de Agar e 400 ml de água destilada), previamente autoclavado a 121° C, por 20 minutos a 1 atm. Após a inoculação com conídios, as placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand), a 27° C; 80 ±5% UR e fotofase de 12 horas, durante 10 dias para crescimento e esporulação do fungo.

Após esse período, com o auxílio de uma espátula estéril, os conídios foram retirados da placa de Petri e inoculados em Erlemeyers de 500 ml contendo 100g de arroz parboilizado e 60 ml de água destilada, previamente autoclavados. Os Erlemeyers foram mantidos em B.O.D por 15 dias nas condições descritas anteriormente. O processo de coleta de conídios foi realizado em câmara de fluxo previamente desinfetada com álcool 70% e 15 minutos de exposição à radiação ultravioleta (UV). Para o preparo da suspensão para utilizar nos ensaios, os conídios dos fungos foram suspensos em Tween 80 a 0,01% (v/v) e a concentração foi estimada utilizando um hemocitômetro Neubauer. Para obter a concentração final de 1×10^8 conídios por ml, foram feitas diluições seriadas (GURULINGAPPA et al., 2010). A viabilidade

dos conídios de cada isolado foi avaliada de acordo com Greenfield et al. (2016).

4.2 Obtenção e criação de *Spodoptera frugiperda*

Os insetos foram obtidos de uma coleta realizada em uma propriedade rural localizada na cidade de São Luis/ MA. As lagartas provenientes do campo foram individualizadas em tubos de ensaio (8,5 cm de altura x 2,5 cm de diâmetro) contendo dieta artificial e, posteriormente, foram acondicionados em sala de criação com temperatura (25 ± 1 °C), umidade relativa ($70 \pm 10\%$) e fotofase de 12 horas.

As lagartas permaneceram nos tubos de ensaio com dieta artificial adaptada de Nalim (1991) até a fase de pupa, sendo separadas por sexo e colocadas em gaiolas confeccionadas com tubo de PVC (10 cm de diâmetro x 21 cm de altura), fechado na base com um recipiente plástico forrado com papel e na parte superior com tecido voil. Os tubos de PVC foram revestidos em seu interior com papel sulfite para facilitar a retirada das posturas. Para a alimentação dos adultos, foi ofertada uma solução de mel a 10%. As posturas foram acondicionadas em tubos de ensaio (8,5 cm de altura x 2,5 cm de diâmetro) vedados com algodão hidrófilo e mantidas na sala de criação nas mesmas condições descritas anteriormente, até a eclosão das lagartas (NALIM, 1991). Para início dos experimentos foram utilizadas larvas da segunda geração (F2).

4.3 Bioensaios de virulência fúngica utilizando isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* contra larvas de *S. frugiperda*

Para verificar a virulência dos isolados de *M. anisopliae* (ESALQ 818 e LPP M1) e de *B. bassiana* (LPP 129 e LPPSP1) sobre as lagartas de *S. frugiperda*, foram realizados bioensaios de contato direto. Foram utilizadas lagartas de 3º instar, as quais foram imersas em suspensões de conídios dos quatro isolados (1×10^8 conídios ml^{-1} em Tween 80 0,01% v/v) e o tratamento controle somente usando Tween 80 (0,01% v/v) por 10 segundos e transferidas para placas de Petri com dieta artificial (PARRA, 1999). As placas foram vedadas e mantidas a $25 \pm 0,5$ °C; fotoperíodo de 12 horas L e 12 escuro. As avaliações foram feitas diariamente durante 10 dias. O experimento teve quatro repetições com 20 lagartas por isolado, totalizando 80 lagartas por tratamento. As lagartas mortas foram transferidas para placas de Petri contendo papel filtro úmido (câmara úmida) e colocadas em B.O.D. a $25 \pm 0,5$ °C para se confirmar a mortalidade e realizada identificações microscópicas das estruturas vegetativas dos fungos (ALMEIDA,

2009). Para análises estatísticas, foi utilizado o teste Log-rank (Mantel-Cox) para comparação das curvas de sobrevivência, e a análise de Kaplan-Meier para o cálculo do tempo médio de sobrevivência (S_{50}) (software: GraphPad Prism).

4.4 Inoculação dos fungos e determinação da colonização endofítica em plantas de milho

Foram utilizados os dois isolados mais virulentos de acordo com os resultados do bioensaio acima. A inoculação dos conídios dos isolados de *M. anisopliae* (ESALQ 818) e *B. bassiana* (LPP SP1), foi feita por pulverização foliar em plantas de milho, de acordo com Russo et al. (2015). Foram utilizadas sementes de milho da variedade UENF 506-11, livres de inseticidas ou fungicidas. Antes da inoculação, as sementes foram esterilizadas com etanol (70%) por 2 minutos, hipoclorito de sódio (1,5%) por 3 minutos e tríplice lavagem com água destilada estéril (AKTUSE et al., 2019). Foi retirada uma alíquota de 20 μ l da última água de lavagem, a qual foi colocada em meio de cultura SDA e deixada em B.O.D durante 7 dias, para verificar a eficiência da esterilização. Em seguida, as sementes foram secas em papel filtro estéril em uma cabine de fluxo laminar previamente esterilizada, por 30 min, semeadas em vasos plásticos de 5L a 4 cm de profundidade, preenchidos com solo estéril adubado com NPK 16-16-16 e mantidos em condição de semi-campo em casa de vegetação com sombrite 50% e regadas quando necessário.

O experimento foi conduzido durante os meses de junho a dezembro de 2021 (Figura 1). Durante esse período o município de São Luís obteve uma amplitude de temperatura de 25 °C a 32 °C com umidade relativa do ar de 71,46 a 86,70%, portanto, a execução do experimento ocorreu dentro de níveis aceitáveis para o desenvolvimento da cultura.

Plantas de milho com duas folhas verdadeiras, três semanas de idade, foram inoculadas com os conídios dos isolados selecionados e deixadas envoltas com sacos plásticos por 24 h, com a finalidade de favorecer a colonização. Antes da inoculação, o substrato foi coberto com papel alumínio, para evitar a contaminação com os conídios. Foi utilizado um pulverizador manual (80 ml) para pulverizar cada muda com 3 ml de suspensão de conídios em Tween 80 a 0,01% (POSADA et al., 2007). No tratamento controle, as plantas de milho foram pulverizadas com uma solução de Tween 80 a 0,01%.

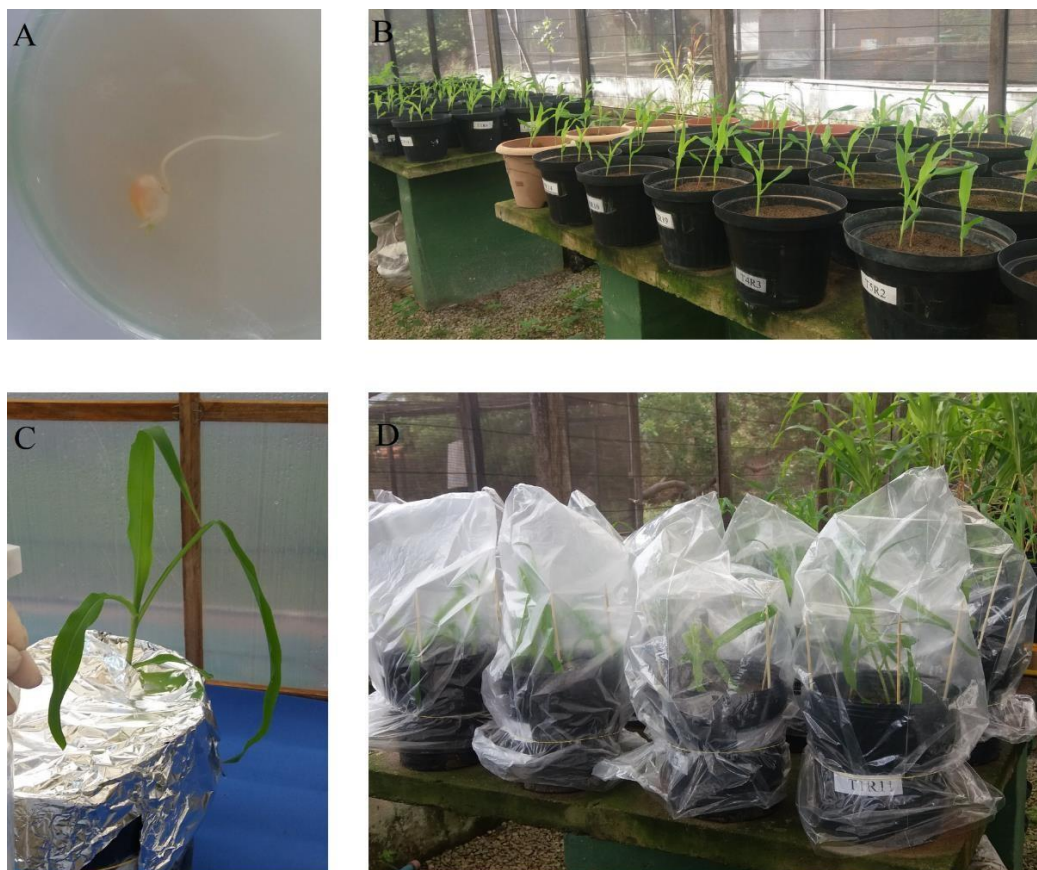


Figura 1. Execução do experimento de inoculação dos fungos endofíticos em plantas de milho, via pulverização foliar. A) Semente em meio de cultura, evidenciando a eficiência do método de limpeza das sementes. B) Plantas de milho com 3 semanas de idade em casa de vegetação, prontas para inoculação. C) Proteção do substrato para aplicação da suspensão de conídios. D) Plantas de milho envoltas em saco plásticos, após serem inoculadas.

Foram avaliadas 75 plantas de milho (25 mudas tratadas com *M. anisopliae*; 25 mudas tratadas com *B. bassiana* e 25 plantas controle) quanto a presença ou ausência dos isolados fúngicos testados aos 7, 14, 21, 28 e 90 dias após a inoculação (DPI), de acordo com Russo et al. (2015). Cada planta foi separada em raízes, caules e folhas e, em seguida, esterilizadas superficialmente por imersões sucessivas em etanol (70%) por 2 min, hipoclorito de sódio (55 g Cl/L de alvejante comercial) por 2 min e enxaguada três vezes com água destilada estéril. Para determinar a eficiência do método de esterilização das diferentes seções da planta, foi retirado uma alíquota 20 μ l da última água de enxague e colocada em meio SDA sólido (REDDY et al., 2009; MUVEA et al. 2015; PARSA et al. 2016).

Cada tecido das plantas tratadas e do controle foram cortadas com um bisturi estéril em pedaços de 0,5 cm². Seis partes de cada tecido da planta foram colocadas em placas de Petri com meio SDA (VEGA et al., 2008).

Todas as placas de Petri foram mantidas a 27 °C em B.O.D (fotófase 12:12 a 25 °C) e examinadas após 7 dias de incubação. No momento em que os fungos foram observados na interface do tecido da planta com a superfície do meio de cultura, as estruturas dos fungos foram reisolados em meio SDA, e cultivadas até o aparecimento de conidióforos, para identificação morfológica dos gêneros (LACEY, 2015). Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado e os dados foram expressos em frequência de colonização (FC); onde a frequência de colonização (FC) = (número de seções de plantas colonizadas/ número total de seções de plantas examinados) × 100 (PETRINI; FISHER, 1986). Para análise dos dados foi realizada a análise de variância de uma via (ANOVA) e os grupos de médias foram comparados através do teste de Tukey, utilizando o software SIGMA PLOT.

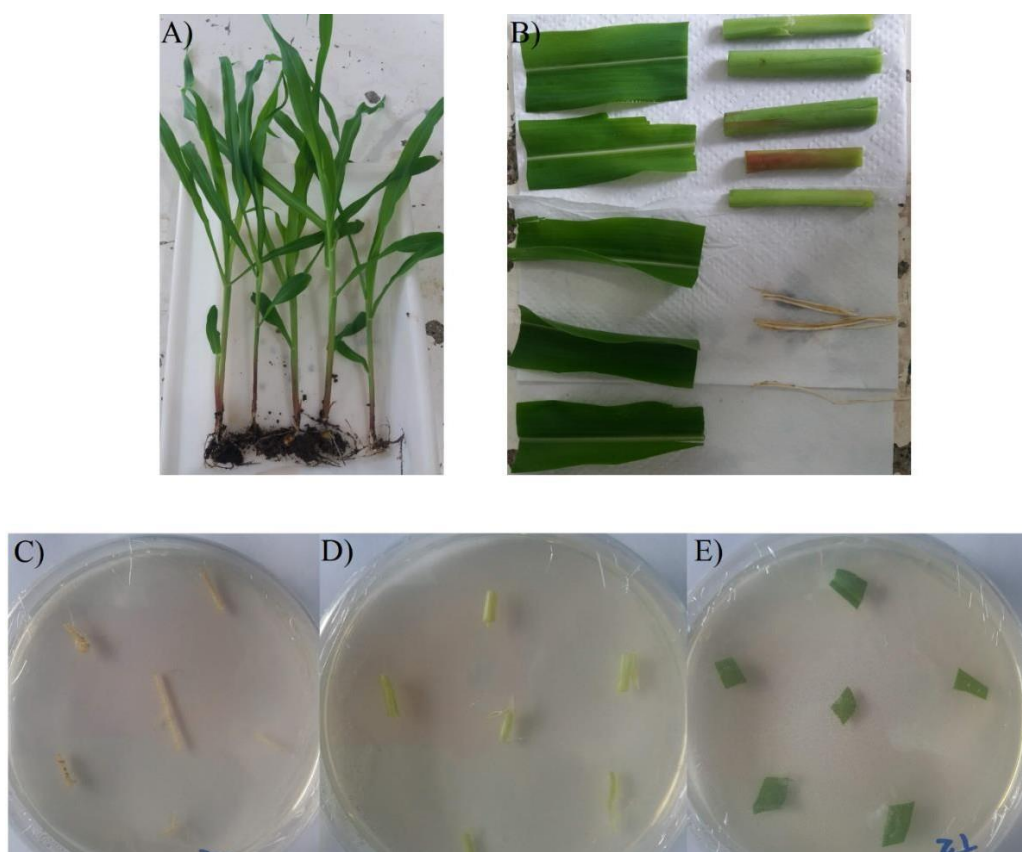


Figura 2. Avaliação do estabelecimento dos fungos nas plantas, após a inoculação. A) Coleta de cinco plantas aleatórias para posterior limpeza com água corrente e secção das partes. B) Partes das plantas seccionadas que foram avaliadas quanto a presença dos fungos. C) Placa de Petri com meio de cultura SDA, com seis pedaços de raiz. D) com seis pedaços de caule. E) com seis pedaços de folha.

4.5 Avaliação dos parâmetros agronômicos

Com o objetivo de avaliar o crescimento das plantas associadas aos fungos ESALQ SP1 e ESALQ 818, cinco plantas tratadas e cinco plantas do controle pulverizadas com Tween 80, foram escolhidas de forma aleatória para a medição dos seguintes parâmetros: diâmetro do caule (mm; com Vernier caliper); altura da planta (cm; com uma régua de aço); contagem de número de folhas; comprimento da raiz (cm), e área foliar (cm). O cálculo da área foliar foi realizado com a multiplicação do comprimento pela largura da mesma folha, seguido de multiplicação de um fator de 0,77 para o ajuste (FRANCIS et al., 1969). Esses parâmetros foram estimados em 15, 30 e 90 DPI. Esse método de medir folhas foi utilizado por ser simples e não destrutivo as plantas. Os valores médios para os dados de crescimento da planta foram analisados para diferenças estatísticas usando ANOVA de uma via (software SIGMAPLOT).

4.6 Sobrevivência de larvas de *S. frugiperda* expostas a plantas de milho colonizadas endofiticamente com *M. anisopliae* ou *B. bassiana*

As folhas de milho colonizadas com os isolados ESALQ 818 de *M. anisopliae* e LPP SP1 de *B. bassiana*, foram oferecidas às larvas de *S. frugiperda*, conforme descrição anterior. As folhas foram removidas das plantas a 28 DPI, período em que o experimento anterior havia confirmado 100% de colonização. Em seguida, seções de folhas (2 cm x 1cm) tratadas com fungos e folhas sem tratamento, foram colocadas em placas de Petri (90 mm x 15 mm) contendo papel filtro úmido, e uma larva de 3º ínstar de *S. frugiperda* foi colocada individualmente em cada placa de Petri (MAGRINI et al., 2015). A taxa de sobrevivência de um total de 80 larvas de *S. frugiperda* foi avaliada diariamente, durante 10 dias, e folhas frescas (não colonizadas com fungo) foram colocadas para alimentação das larvas nas placas de Petri em cada dia de avaliação. As larvas mortas foram removidas diariamente e colocadas em placas de Petri com papel de filtro levemente umedecido para avaliar a conidiogênese. Os dados da taxa de sobrevivência dos insetos foram analisados usando o programa estatístico GraphPad Prism 7, como descrito anteriormente. Para este bioensaio foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado e foram realizadas quatro repetições com 20 larvas de 3º ínstar de *S. frugiperda* para os isolados ESALQ 818 de *M. anisopliae*, LPP SP1 de *B. bassiana* e controle, totalizando 80 lagartas para cada tratamento. As larvas do grupo controle receberam folhas não tratadas com fungos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Bioensaio de virulência fúngica via contato direto com conídios dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*

Todos os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* testados apresentaram patogenicidade a larvas de 3º instar de *S. frugiperda* após o contato direto dos insetos com as suspensões fúngicas. Os isolados ESALQ 818 de *M. anisopliae* e LPP SP1 de *B. bassiana* foram os mais virulentos a *S. frugiperda* em comparação com os isolados LPP 129 e LPP M1. Ao comparar as curvas de sobrevivência entre tratamentos (teste Log-Rank), foi observado que larvas de *S. frugiperda* tratadas com os isolados fúngicos apresentaram menor percentual de sobrevivência em contraste ao controle ($\chi^2 = 339,3$; g.l = 4; $P < 0,0001$) (Figura 3).

O tempo médio de sobrevivência (dias) variou entre tratamentos ($\chi^2 = 53,43$; g.l = 4; $P < 0,0001$). Os dois isolados mais virulentos foram *M. anisopliae* (ESALQ 818) e *B. bassiana* (LPP SP1), com tempo médio de sobrevivência (dias) de 3 dias, respectivamente; enquanto *B. bassiana* (LPP 129) obteve a S_{50} de 6 dias. Ao final do experimento, o isolado *M. anisopliae* LPP M1 demonstrou pouca virulência à *S. frugiperda*, com 65% de sobrevivência das larvas, portanto não gerando valor de S_{50} . É importante ressaltar que a taxa de sobrevivência percentual final, após 10 dias, foi diferente para todos os quatro isolados. Para os dois isolados mais virulentos (ESALQ 818, LPP SP1) ao sexto dia após a avaliação, havia 95% e 100% de mortalidade, respectivamente (Figura 3).

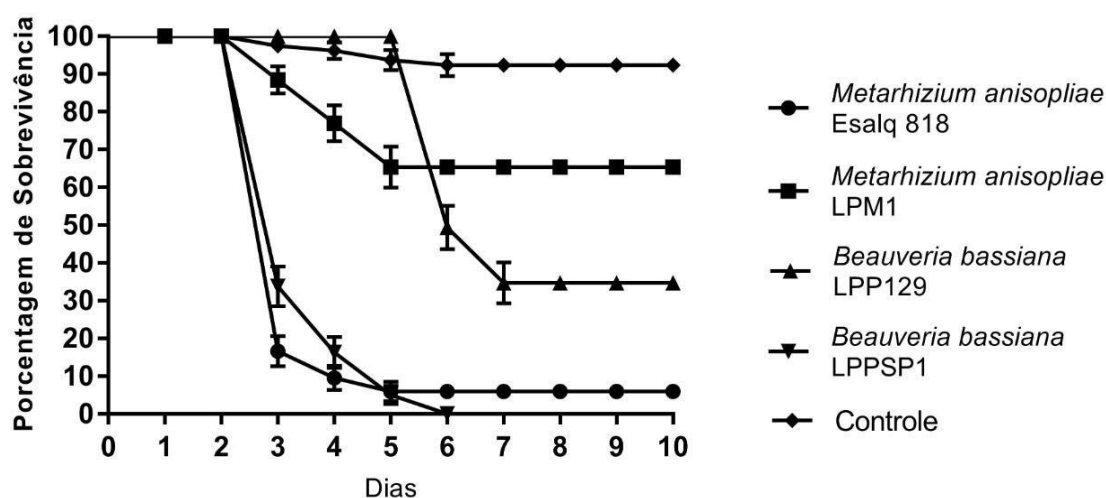


Figura 3. Curvas de sobrevivência de larvas de *S. frugiperda* após exposição a conídios de *M. anisopliae* ESALQ 818 e LPPM1; *B. bassiana* LPP 129 e LPP SP1. Os resultados foram submetidos a ANOVA, com quatro repetições por isolado. Oitenta

insetos foram utilizados por isolado. As larvas do grupo controle foram tratadas apenas com Tween 80 (0,01% v / v). Barras de erro padrão (SE).

Os resultados foram semelhantes aos descritos por Ramos et al., (2020), ao demonstrarem que os isolados *M. anisopliae* Ma-30 e *B. bassiana* Bb-18, causaram mortalidade de larvas de 2° e 4° ínstar de *S. frugiperda* no terceiro e quarto dia após o tratamento, respectivamente. Ainda nesse estudo, para as larvas de 2° ínstar houve mortalidade de 100% até o nono dia após aplicação dos tratamentos e para as larvas de 4° ínstar a mortalidade máxima foi de 75%. Em nossos estudos, a taxa de sobrevivência do grupo controle, após 10 dias, foi de 92%. Em geral, a conidiogênese foi observada em 74% dos cadáveres de insetos expostos ao fungo e nenhuma conidiogênese foi observada no controle (Figura 4).

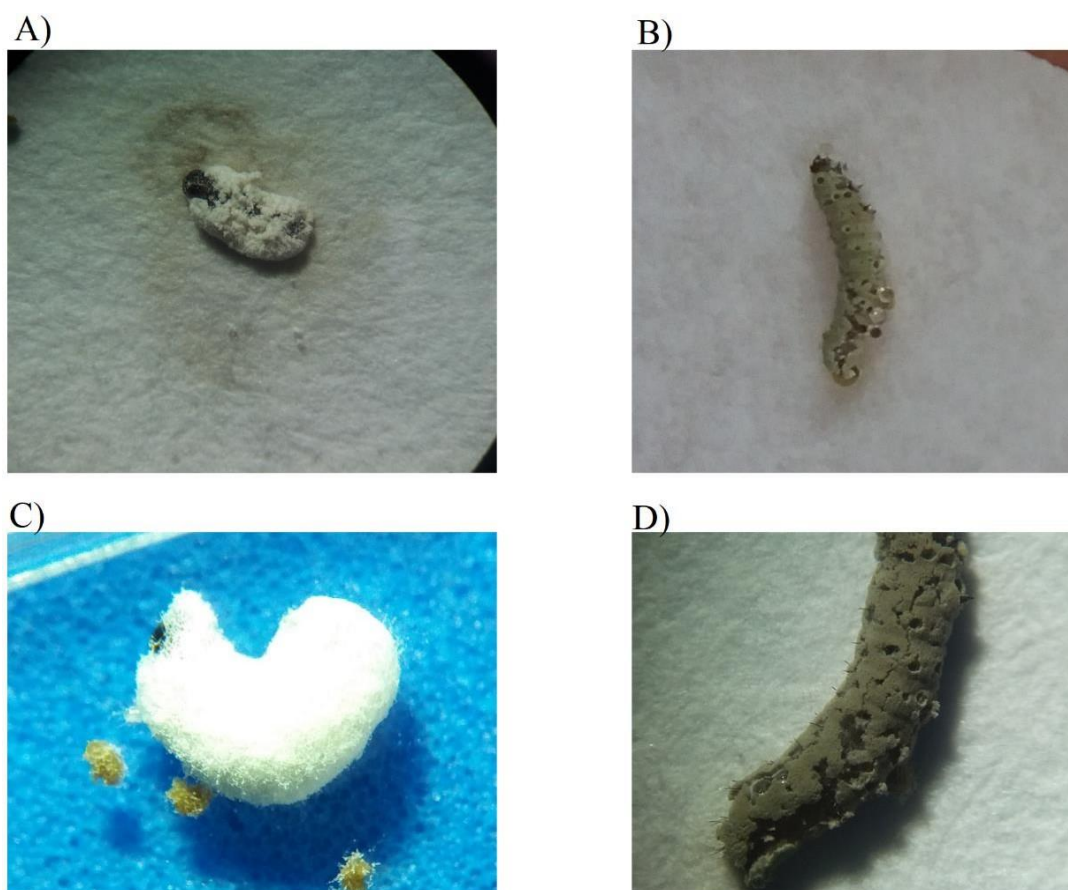


Figura 4. Resultados do bioensaio de virulência, confirmando a conidiogênese dos isolados em larvas de 3° ínstar de *S. frugiperda*. A) Conidiogênese após a morte de larvas de *S. frugiperda* colonizadas pelo isolado *B. bassiana* LPP 129. B) Conidiogênese do isolado *M. anisopliae* ESALQ 818. C). Conidiogênese do isolado *B. bassiana* LPP SP1. D) Conidiogênese do isolado *M. anisopliae* LPP M1.

Embora 34% das larvas expostas ao isolado LPP129 tenham sobrevivido ao décimo dia de avaliação, e os sobreviventes tenham passado para a fase de pupa, esses insetos apresentaram

mal formações morfológicas (observação visual). Das pupas que conseguiram passar ao estágio seguinte, os adultos também apresentaram deformações morfológicas, conseqüentemente, não conseguiram completar o ciclo de vida (Figura 5). Resultados semelhantes foram observados por Gustianingtyas et al., (2021) e Herlinda et al., (2020), os quais, investigando a patogenicidade de fungos do gênero *Beauveria* e *Metarhizium* contra *S. frugiperda*, observaram que as larvas, pupas e adultos apresentavam mal formações, após serem inoculados com os conídios de fungos. Da mesma maneira, Souza et al., (2020), analisando virulência fúngica de isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* contra *Helicoverpa armígera* observaram que somente o isolado *B. bassiana* IBCB 1363 causou deformidades em pupas e adultos.



Figura 5. Deformações em pupas de *S. frugiperda* provenientes de larvas inoculadas com conídios fúngicos do isolado *B. bassiana* LPP129 (A e B); adulto deformado (C) e pupa de *S. frugiperda* que não completou ecdise (D).

A infecção nos insetos ocorre quando os conídios do fungo germinam, crescem e penetram a cutícula do hospedeiro, utilizando-o como fonte de nutrientes para a produção de conídios (ORTIZ-URQUIZA et al., 2016; HORTA et al., 2017. Durante o processo germinativo, a velocidade em que a estrutura reprodutiva do fungo consegue penetrar a cutícula

do inseto depende do isolado, das condições ambientais e principalmente de mecanismos comportamentais, fisiológicos e imunológicos do inseto, que podem impedir a germinação do esporo (VEGA, 2018). Portanto, esses fatores citados, podem refletir em diferenças na produção de enzimas e toxinas e como as mesmas afetam o inseto, influencia também na adesão, velocidade de germinação de conídios, atividade de penetração da cutícula, bem como na capacidade de colonização e especificidade dos fungos (CONCESCHI, 2017).

Os isolados ESALQ 818 de *M. anisopliae* e LPP SP1 de *B. bassiana*, tiveram resultados semelhantes quanto a virulência, ao contrário do isolado LPP M1 que foi de baixa virulência. Diferentemente dos dois isolados mais virulentos, o isolado LPP 129, mostrou-se medianamente virulento (Figura 3), com um maior tempo de S_{50} , em que as lagartas sobreviventes chegaram até a fase de pupa, na qual ocorreu malformações morfológicas, levando-as a morte. Essas variações de resultados de virulência podem estar relacionadas a produção de enzimas extracelulares e toxinas e ao processo de infecção dos fungos, que incluem a adesão, penetração e colonização dos fungos em insetos (MORA et al., 2016; MASCARIN et al., 2016; MANNINHO et al., 2019).

As deformações morfológicas observadas em larvas tratadas com o isolado LPP 129, podem ser explicadas pelo sistema de defesa dos insetos, que é composto por barreiras estruturais presentes na cutícula e respostas contra elementos estranhos que alcançam a hemocele, local de colonização dos fungos entomopatogênicos (BIANCO et al., 2015). Os fungos agem no tegumento, e para que o fungo consiga penetrar a cutícula do inseto, envolve uma secreção de diversos compostos, tais como, enzimas hidrolíticas (proteases, quitinases, lipases), que são responsáveis pela degradação da cutícula e também por suprimir a resposta imune do inseto (MORA et al., 2016). O tegumento do inseto é uma barreira que ao ser rompida, uma variedade de mecanismos celulares e hormonais são desencadeadas, resultando em resposta imunológica (SAFAVI et al., 2017). Durante essas respostas, os insetos perdem proteínas e lipídeos essenciais no processo de ecdise, fundamental para completar o ciclo (QU e WANG, 2018). Portanto, para formação das novas cutículas, esse processo pode estar ligado aos nutrientes que são obtidos na fase de lagartas (LOUREIRO et al., 2020), isso poderia explicar a mal formação das pupas e a não emergência dos adultos, observadas no presente estudo.

5.2 Inoculação dos fungos e determinação da colonização endofítica em plantas de milho

A avaliação da colonização dos isolados ESALQ 818 de *M. anisopliae* e LPP SP1 de *B. bassiana*, inoculados via pulverização foliar, confirmou nossa hipótese que os fungos conseguem colonizar plantas de milho. A presença endofítica dos fungos foi verificada nas plantas tratadas com os isolados, e conforme desejado não foram observados fungos entomopatogênicos na forma endofítica no grupo controle (Figura 6). A porcentagem de colonização foi calculada de acordo com a presença ou ausência dos isolados, sendo avaliada nas diferentes partes vegetais, descrita como contagem positiva (presença do fungo) e contagem negativa (ausência do fungo). Através da ANOVA de uma via, foi comparado as taxas de colonização entre os tempos de avaliação (7, 14, 21, 28 e 90 dias após a inoculação). Nenhum crescimento fúngico foi observado na última água de enxágue e em placas com sementes desinfestadas, comprovando a eficácia do procedimento de desinfestação da superfície dos tecidos, portanto, confirmando que os fungos que cresceram a partir dos pedaços de plantas eram endófitos.

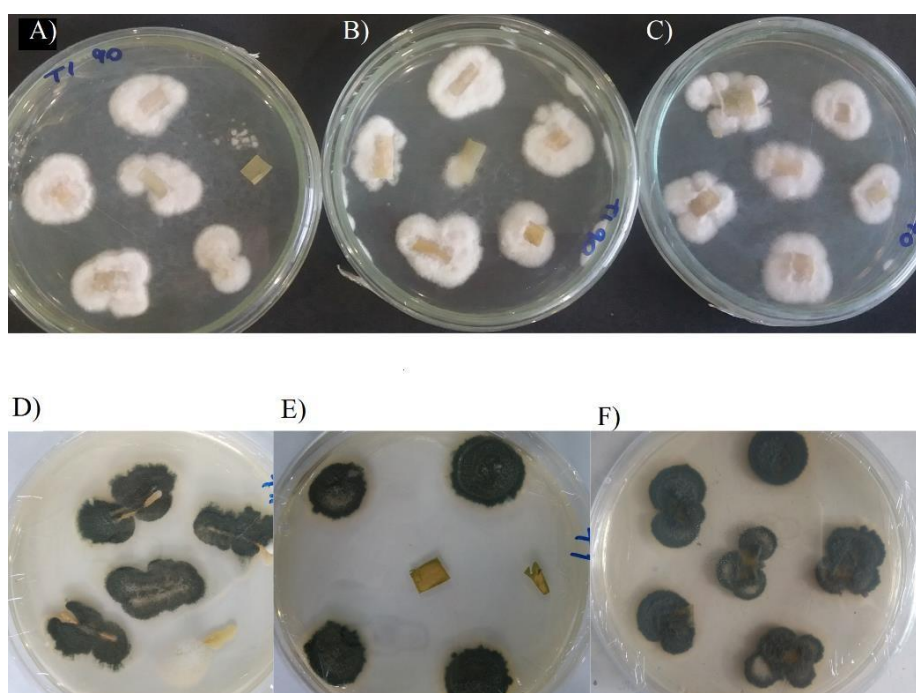


Figura 6. Resultado da inoculação dos isolados ESALQ 818 de *M. anisopliae* e LPP SP1 de *B. bassiana*, via pulverização foliar em plantas de milho, evidenciando o crescimento dos fungos dos tecidos das plantas. A), B) e C) Fungo *B. bassiana* LPP SP1 crescendo de tecidos foliares. D) Fungo ESALQ 818 de *M. anisopliae* crescendo de raiz. E) Fungo ESALQ 818 de *M. anisopliae* crescendo de caule. F) Fungo ESALQ 818 de *M. anisopliae* crescendo de folhas de milho.

Analisando a colonização dos fungos entomopatogênicos na forma endofítica, em cada parte da planta ao longo do tempo, foram verificadas diferenças significativas quanto a porcentagem de colonização nas raízes para o isolados ESALQ 818 de *M. anisopliae*. O isolado ESALQ 818 ($P = 0,431$; $F = 1$) registrou apenas 6% de colonização nas raízes aos 7 DPI, não permanecendo ao longo do tempo (Figura 7). Já para o isolado LPP SP1 ($P = 0,450$; $F = 0,963$) não foi verificado colonizando as raízes das plantas aos 7 DPI, porém, o isolado teve sua presença confirmada de 14 a 90 DPI (Figura 8).

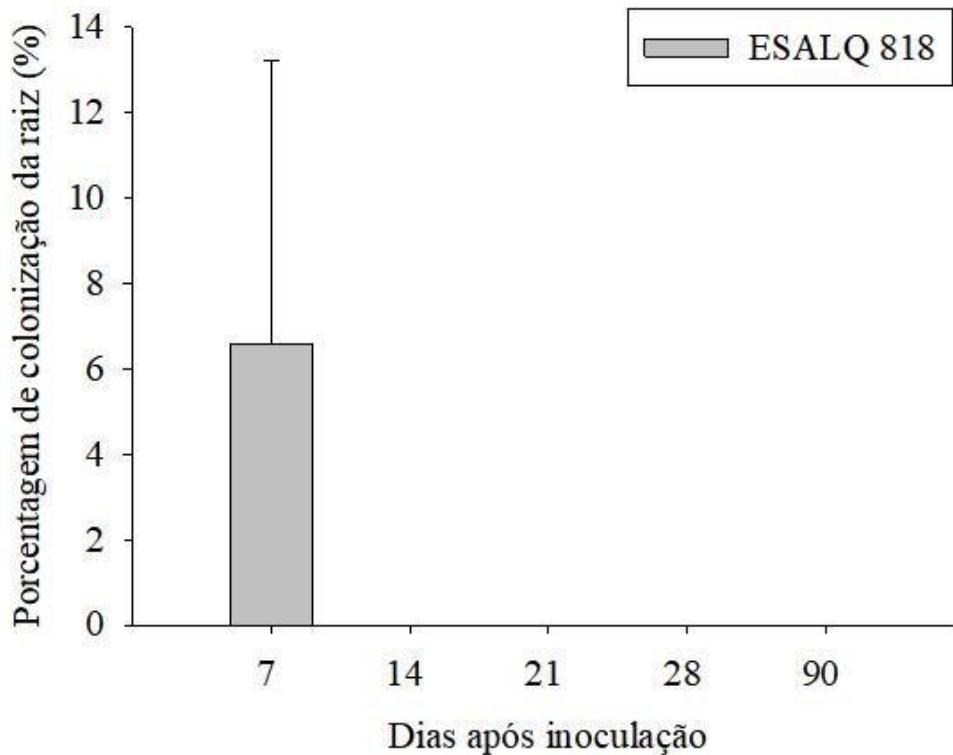


Figura 7. Porcentagem de colonização de *M. anisopliae* ESALQ 818 em raiz de plantas de milho, ao longo do tempo em dias após a inoculação (7, 14, 21, 28 e 90 dias). Barras de erro padrão (EP). O fungo não foi detectado nos tempos 14, 21, 28 e 90 dias.

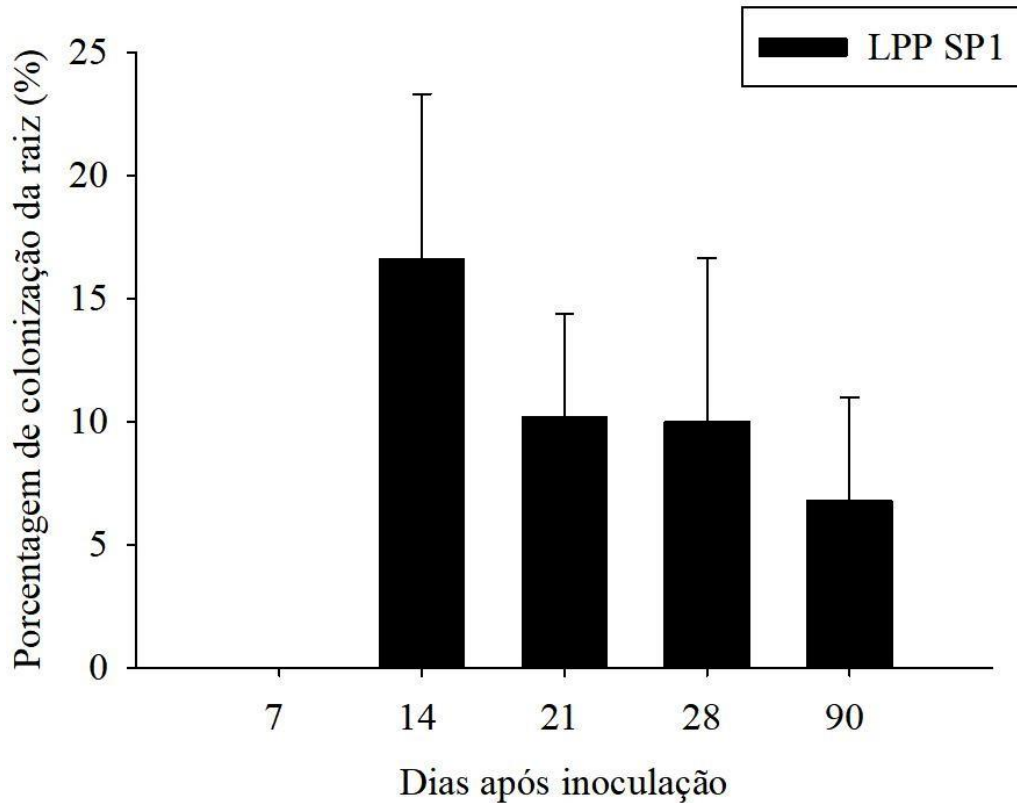


Figura 8. Porcentagem de colonização de *B. bassiana* LPP SP1, em raiz de plantas de milho, ao longo do tempo (dias) após a inoculação (7, 14, 21, 28 e 90 dias). Barras de erro padrão (EP). Não houve diferença estatística entre os dias de avaliação.

Diferentemente da raiz, os tecidos caulinares apresentaram maiores porcentagens de colonização para ambos os isolados. O isolado ESALQ 818 ($P = 0,315$; $F = 1,269$) obteve colonização endofítica com contagens positivas para os caules no período de 7 a 28 DPI, chegando a 30% aos 28 DPI (Figura 9). O isolado LPP SP1 ($P = 0,330$; $F = 1,229$) também obteve colonização endofítica nos caules do 7 a 90 DPI, chegando a 29,8% aos 90 DPI, não havendo diferenças estatísticas para nenhum dos isolados (Figura 10).

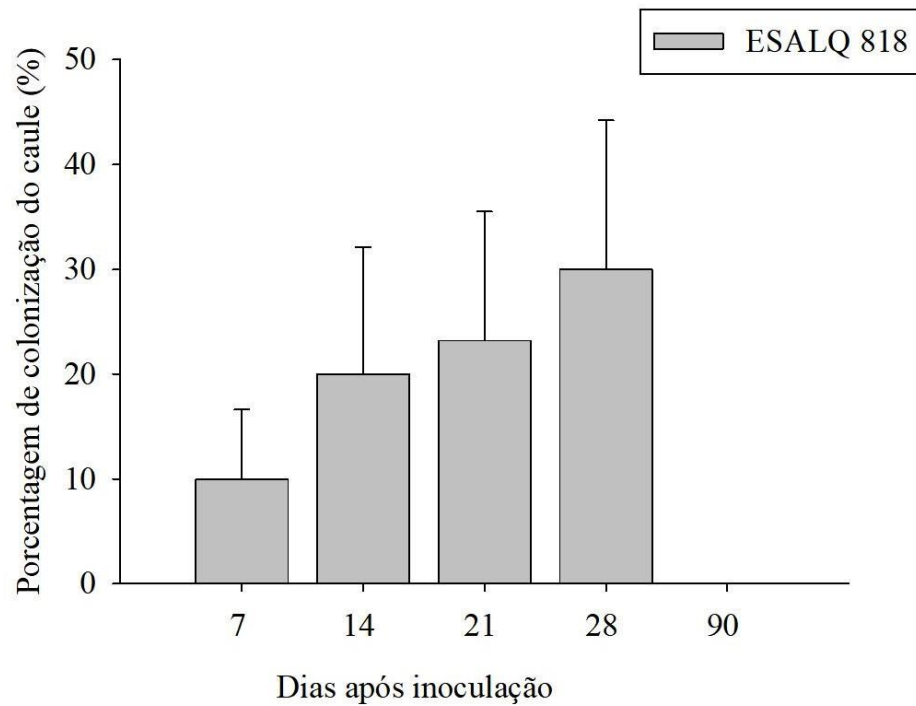


Figura 9. Porcentagem de colonização de *M. anisopliae* ESALQ 818 em caule de plantas de milho, ao longo do tempo (dias) após a inoculação (7, 14, 21, 28 e 90 dias). Barras de erro padrão (EP). Não houve diferença significativa entre os dias de avaliação.

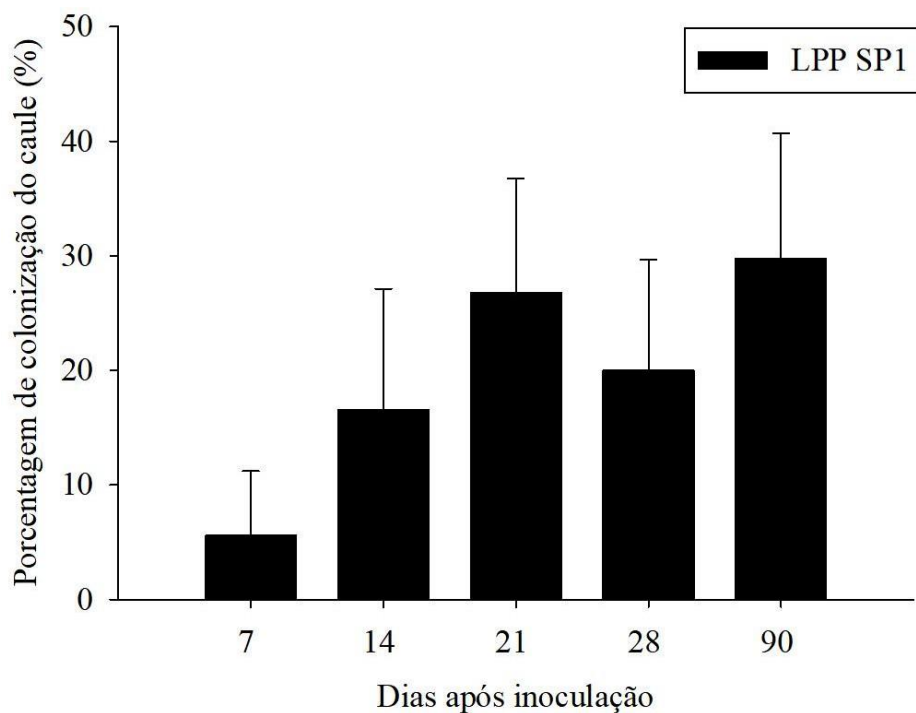


Figura 10. Porcentagem de colonização de *B. bassiana* LPP SP1, em caule de plantas de milho, ao longo do tempo (dias) após a inoculação (7, 14, 21, 28 e 90 dias). Barras de erro padrão (EP). Não houve diferença significativa entre os dias de avaliação.

Com relação ao tecido foliar, foram quantificadas as maiores porcentagens de colonização para os dois isolados aos 90 DPI, em comparação com os outros tecidos avaliados. Neste estudo, o isolado ESALQ 818 ($P= 0,085$; $F= 2,387$) permaneceu no tecido foliar dos 7 aos 90 DPI, com maior valor aos 90 DPI com 66% de colonização endofítica, porém não havendo diferenças estatísticas entre os períodos avaliados (Figura 11). Já o isolado LPP SP1 ($P = 0,001$; $F= 13,048$) apresentou diferença significativa ao longo do tempo, em que 90 DPI apresentou 86,4 % de colonização, seguido de 14 e 28 DPI com 56,4 % e 63% respectivamente (Figura 12). Esses resultados demonstram que os dois isolados utilizados conseguem persistir por bastante tempo em caules e folhas na forma endofítica. Portanto, os mesmos foram introduzidos em plantas de milho pelo método de inoculação foliar e utilizados no próximo bioensaio, para verificar o efeito da colonização da planta com fungos entomopatogênicos endofíticos contra *S. frugiperda*.

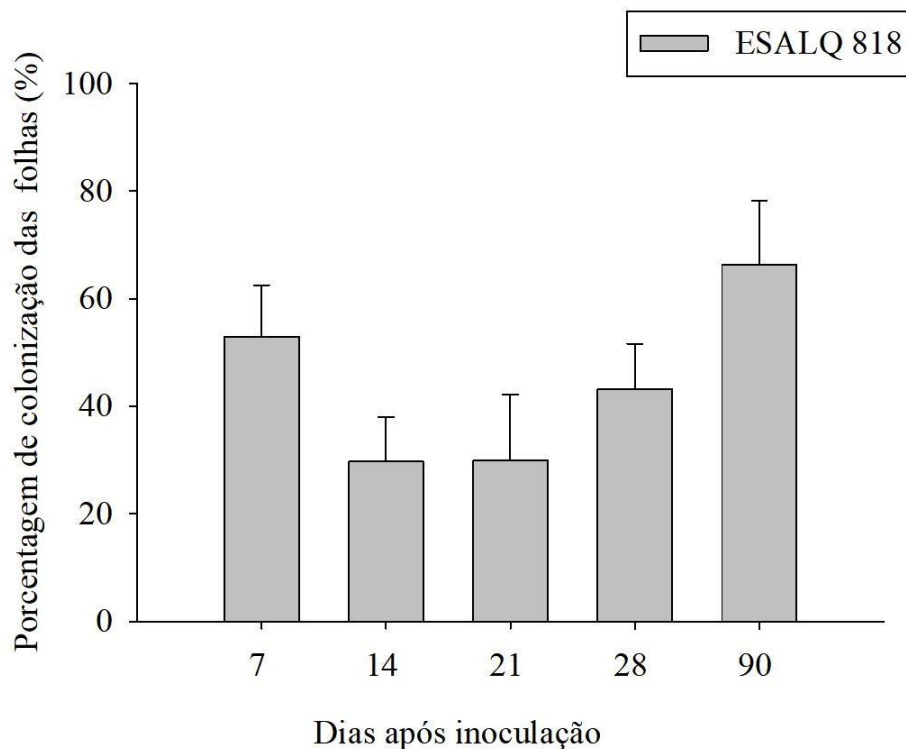


Figura 11. Porcentagem de colonização de *M. anisopliae* ESALQ 818 em folhas de plantas de milho, ao longo do tempo (dias) após a inoculação (7, 14, 21, 28 e 90 dias). Barras de erro padrão (EP). Não houve diferença significativa entre os dias de avaliação.

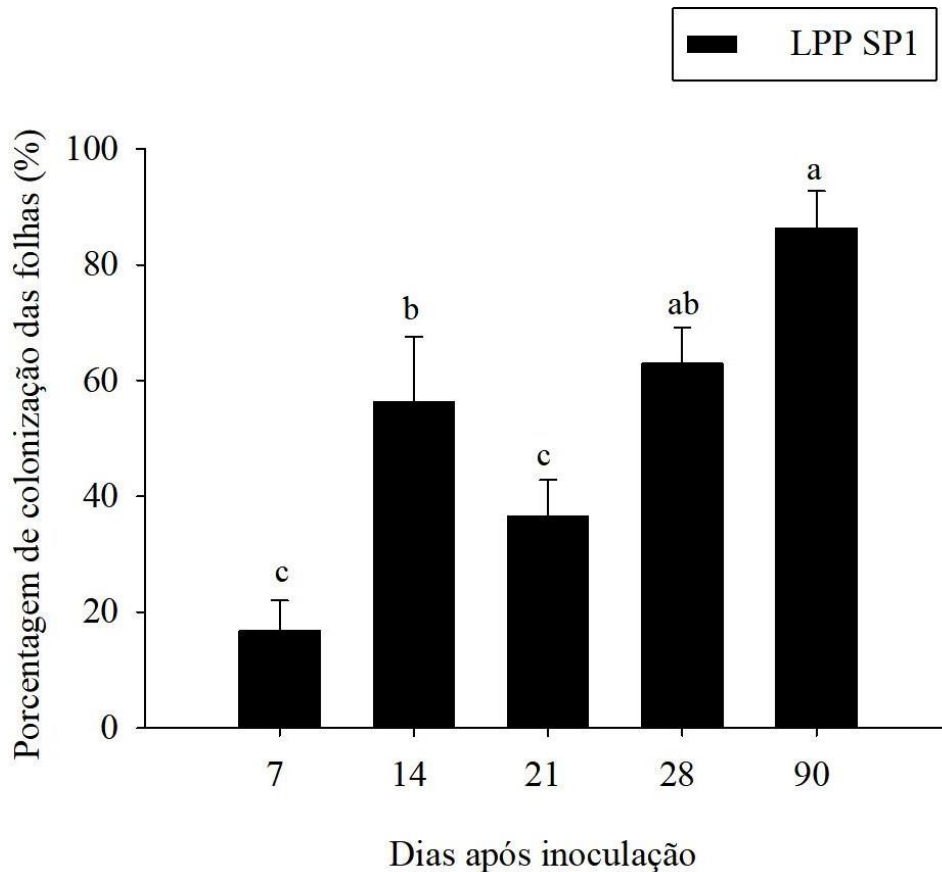


Figura 12. Porcentagem de colonização de *B. bassiana* LPP SP1, em folhas de plantas de milho, ao longo do tempo (dias) após a inoculação (7, 14, 21, 28 e 90 dias). Barras de erro padrão (EP). Médias seguidas por letras diferentes indicam diferenças estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, da presença do fungo na folha ao longo do tempo.

No presente estudo, a inoculação de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em plantas de milho resultou em uma colonização duradoura. Rajab et al., (2020), ao testarem vários métodos de inoculação de *B. bassiana* em plantas de pepino, observaram que o fungo permaneceu até 90 DPI em tecidos caulinares e foliares. Assim como Russo et al., (2020), após inocular *B. bassiana* via pulverização foliar em plantas de milho, observaram que o fungo esteve presente nos tecidos foliares até 30 DPI. Adicionalmente, Ramos et al., (2020) ao inocular isolados de

M. anisopliae e *B. bassiana* em plantas de milho, observou colonização positiva dos fungos até 28 DPI, através de encharcamento de solo.

O estabelecimento das duas espécies de fungos como endófitos em caules e folhas mostrou um aumento significativo na porcentagem de colonização ao longo do tempo. Embora, o isolado LPP SP1, apresentou baixa porcentagem de colonização nas raízes, ainda houve um pequeno aumento ao longo do tempo. Ao contrário do isolado ESALQ 818 que teve uma colonização mínima nas raízes e sem persistência. Vale destacar os resultados de colonização nos tecidos foliares, que para os dois isolados, observou-se maior contagem positiva dos fungos, principalmente para o isolado LPP SP1, que aos 90 DPI chegou a uma porcentagem de colonização de 86%. Nossos resultados contrastam com os estudos de Russo et al., (2020) e Ramos et al., (2020) em que houve uma maior colonização de *M. anisopliae* nas raízes do que em folhas e caules de milho, após pulverização foliar. Entretanto, o presente estudo está de acordo com vários trabalhos anteriores (Dutta et al., 2015; Mantzoukas et al., 2015; Kaushik et al., 2016; Ahmada et al., 2020) em que detectaram colonização endofítica de *Metarhizium* spp. e *B. bassiana* em tecidos foliares e caule de plantas de milho. Entretanto, a persistência e o local da planta em que a colonização de fungos entomopatogênicos endofíticos se estabelecem, podem ser influenciadas por espécies e isolados de fungos, as espécies da planta, tecidos diferentes das plantas hospedeiras, e o método de inoculação (VEGA et al., 2018; AHMADA et al., 2020).

Por exemplo, a inoculação de isolados de *M. anisopliae* em sementes da leguminosa *Vicia faba*, resultou na colonização endofítica do tecido radicular aos 30 dias após a inoculação da semente e 7 dias após a inoculação do solo (AKELLO et al., 2012). Plantas de feijão-caupi e pepino cultivadas a partir de sementes inoculadas com diferentes isolados de *Metarhizium robertsii* e *Metarhizium acridum*, mostraram colonização endofítica tanto do tecido foliar quanto radicular (GOLO et al., 2014). Russo et al., (2020) verificaram que *B. bassiana* colonizou 100%, 80% e 60% das folhas, caules e raízes de plantas de milho respectivamente, após a pulverização foliar. Outra observação, segundo Kaushik et al., (2016) é que a inoculação de plantas por pulverização foliar com *M. anisopliae* ou *B. bassiana* pode favorecer a colonização foliar, enquanto a inoculação no solo favorece a colonização radicular. A maior colonização e a frequência de detecção em órgãos da planta próximos ao local de inoculação podem ajudar a explicar uma maior detecção nas raízes do que nas folhas (GREENFIELD et al., 2016). Assim como interações genótipo específicas entre endófitos e seu hospedeiro podem influenciar grandemente o grau e a persistência da relação endofítica (TEHERAN-SIERRA et al., 2021).

No presente estudo, ao analisar a persistência dos fungos até a fase de florescimento do milho, foi possível detectar os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* por até 90 dias na planta, principalmente nos tecidos caulinares e foliares, de forma crescente ao longo do tempo. A persistência de fungos endofíticos por um longo período de tempo na planta, também foi observada por Brownbridge et al., (2012) que re-isolaram *B. bassiana* de mudas de pinus, 120 dias após os tratamentos de imersão das raízes e tratamento de sementes. Estudos de Rajab et al., (2020), testando cinco métodos diferentes de inoculação de *B. bassiana* em plantas de pepino (pulverização de sementes, tratamento de sementes, pulverização foliar, encharcamento de solos e encharcamento de mudas), observou que todos os métodos de inoculação resultaram no estabelecimento endofítico do fungo em plantas de pepino e o fungo sobreviveu no interior da planta por até 90 DPI. Os mesmos autores ainda observaram maiores de taxas de colonização nas folhas e caules do que nas raízes, portanto, os achados desta pesquisa estão em linha com Rajab et al., (2020) .

5.3 Avaliação dos parâmetros agrônômicos

Os resultados das análises dos parâmetros agrônômicos indicaram efeito positivo e significativo no desenvolvimento e crescimento da planta (altura da planta, comprimento de raiz, diâmetro do caule, número de folhas e área foliar) após a colonização por *M. anisopliae* ESALQ 818 ou *B. bassiana* LPPSP1. As médias de fatores de desenvolvimento das plantas após colonização endofítica foram comparadas utilizando Teste de Tukey.

Aos 15 dias após a inoculação, não foi observada diferença significativa entre as plantas dos tratamentos e do controle para o número de folhas, ou seja, todas as plantas permaneceram com 6 folhas. Não houve diferenças estatísticas entre as plantas tratadas com ESALQ 818 e LPP SP1 nos parâmetros altura de planta (cm), variando de 31,2 a 33,4 cm ($F = 6,830$; $P = 0,010$) e comprimento de raiz ($F = 6,727$; $P = 0,011$) em que variou de 10,2 a 11,8 cm e os dois tratamentos diferiram estatisticamente do controle, comprovando que plantas inoculadas com endófitos, tornaram-se maiores (Figura 13 B, C). Quanto a área foliar ($F = 45,415$; $P = <0,001$) e diâmetro do caule, houve diferenças estatísticas entre os isolados testados e o controle. Observa-se que plantas inoculadas com LPP SP1 possuíram maior área foliar (média de 128,5 cm²) e plantas inoculadas com ESALQ 818 tiveram um maior diâmetro de caule (19,9 mm) (Figura 13 A, D).

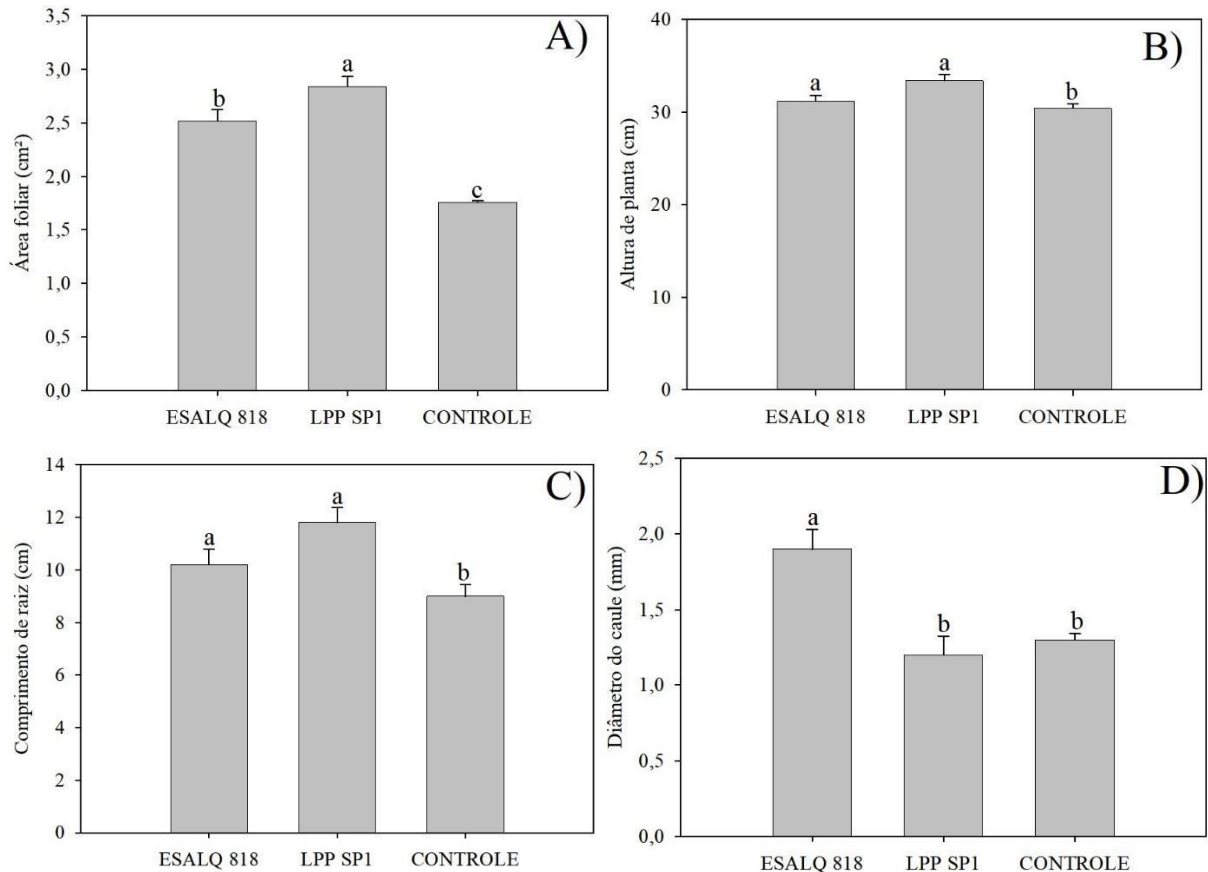


Figura 13. Dados agrônômicos de plantas de milho, aos 15 dias após a inoculação. A) Área foliar. B) altura de planta. C) comprimento da raiz. D) diâmetro de caule. Barra de erro padrão (EP). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Aos 30 dias de avaliação não houve diferenças significativas entre os tratamentos ESALQ 818 e LPP SP1, para o comprimento raiz, em que mediram 21,20 e 20,8 cm respectivamente ($F = 47,370$; $P = <0,001$) e área foliar ($F = 33,855$; $P = <0,001$) que variou entre 191,3 a 207,3 cm² e para número de folhas (todas obtiveram 9 folhas), em que pode-se observar que plantas inoculadas tiveram um melhor desenvolvimento, em comparação com o controle, em que mediu 99,2 cm² (Figura 14 A e C). Em relação à altura de planta ($F = 52,286$; $P = <0,001$) e diâmetro do caule ($F = 14,166$; $P = <0,001$), houve diferenças estatísticas entre todos os tratamentos. Observa-se que as plantas inoculadas com ESALQ 818 obtiveram 41,6 cm de altura e 26 mm de diâmetro de caule, foram superiores a plantas inoculadas com LPP SP1 e controle, em que as medidas variaram 33 a 38,2 cm de altura e 12 a 20 mm de diâmetro de caule. Entretanto, LPP SP1 foi superior ao controle (Figura 14 B e D).

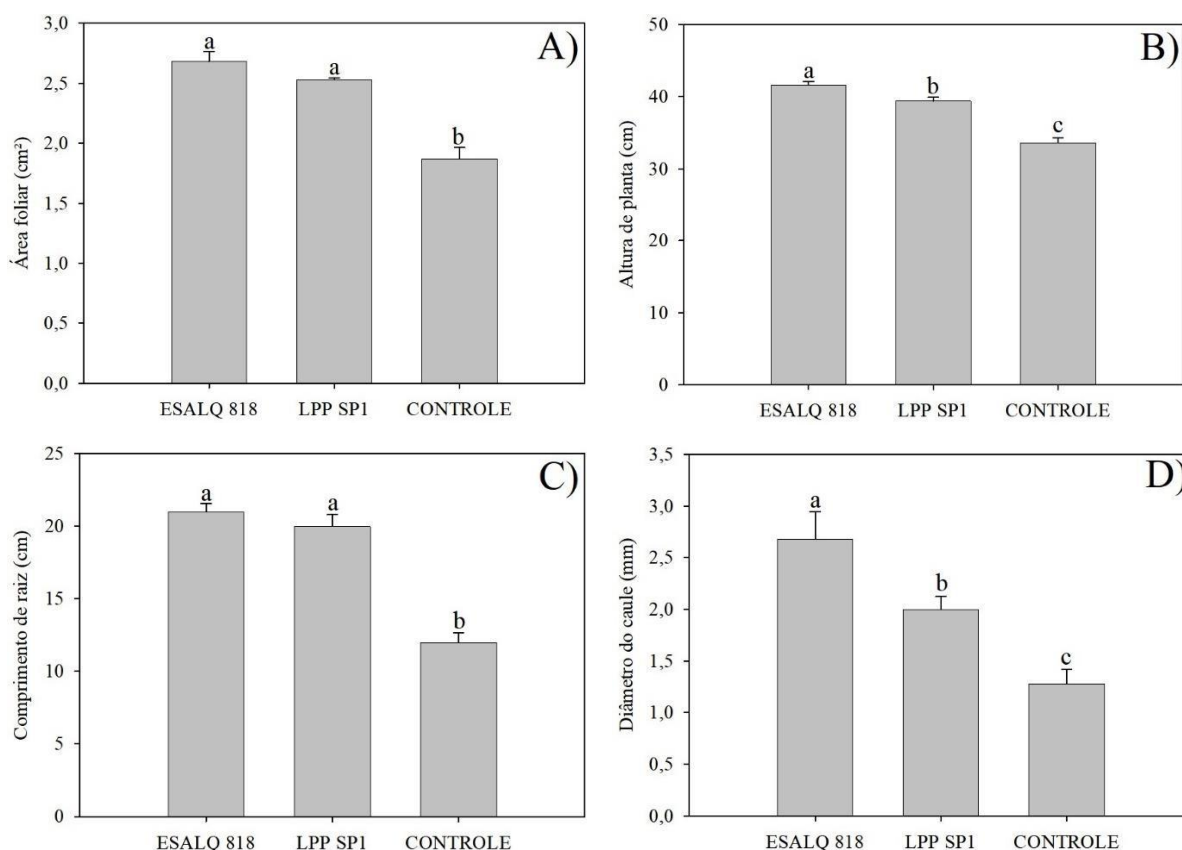


Figura 14. Dados agrônômicos de plantas de milho aos 30 dias após a inoculação: A) Área foliar, B) altura de planta, C) comprimento da raiz e D) diâmetro de caule. Barra de erro padrão (EP). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Da mesma forma, aos 90 dias, foram observadas diferenças significativas para: Altura de planta ($F = 53,965$; $P = <0,001$), comprimento raiz ($F = 77,958$; $P = <0,001$), diâmetro do caule ($F = 92,444$; $P = <0,001$) em que as plantas inoculadas com LPP SP1 foram superiores a plantas inoculadas com ESALQ818 e ao controle (Figura 15 B, C e D). As plantas tratadas com LPP SP1 obtiveram 156,2 cm de altura, 87 cm de comprimento de raiz e 55 mm de diâmetro de caule. Já as plantas tratadas com ESALQ 818 obtiveram 151,6 cm de altura, 82,4 cm de comprimento de raiz e 50mm de diâmetro de caule. Quanto ao número de folhas (18 folhas) e área foliar ($F = 32,571$; $P = <0,001$), não houve diferença estatística entre os dois isolados de fungos em que variou de 420,4 a 423,2 cm e os dois foram superiores ao controle, ao medir 325,1 cm (Figura 15 A).

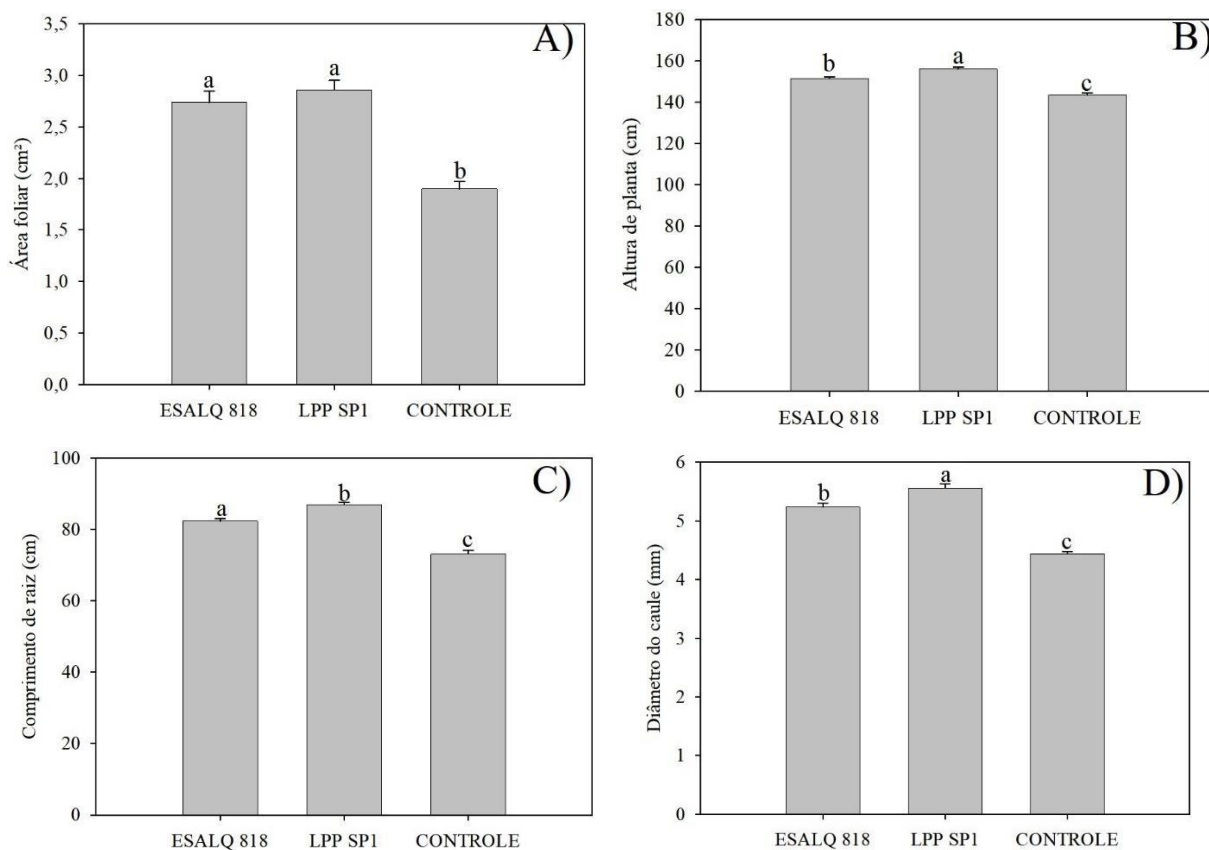


Figura 15. Dados agrônômicos de plantas de milho, aos 90 dias após a inoculação. A) Área foliar. B) altura de planta. C) comprimento da raiz. D) diâmetro de caule. Barra de erro padrão (SE). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Vega (2018) cita trabalhos mostrando que os fungos entomopatogênicos endofíticos podem estimular o crescimento das plantas. No presente estudo, o desenvolvimento da planta foi monitorado durante um período de 90 dias após a inoculação com isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, constatando que houve diferenças nos parâmetros agrônômicos avaliados, ao comparar os tratamentos entre si. Estudos com aplicação de fungos entomopatogênicos de modo endofítico em plantas de milho também observaram diferenças na parte aérea da planta. Lira et al. (2020) demonstraram a capacidade de diferentes isolados de *M. anisopliae* em estimular altura da planta, área foliar e comprimento de raiz em avaliações até 30 dias após a inoculação. Ahmada et al., (2019) também obtiveram plantas de milho maiores em avaliações realizadas no estágio V4, após a inoculação de *M. robertsii*. Da mesma maneira, estudo de Russo et al., (2020) inoculando *B. bassiana* via pulverização foliar em plantas de milho, em avaliações dos parâmetros agrônômicos, como altura de planta e número de folhas, até 30 dias DPI, observaram um incremento no desenvolvimento das plantas.

O incremento de área foliar, altura de planta, diâmetro de caule e comprimento de raiz em plantas tratadas com isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, indica claramente que existe uma interação entre fungo e planta. Segundo alguns, esta interação possibilita um aumento no desenvolvimento vegetativo de plantas hospedeiras e, conseqüentemente, aumento na produção (ENKERLI, 2016; CANASSA et al., 2019).

Neste estudo, foi comprovada que a aplicação via pulverização foliar de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, em plantas de milho, resultou em colonização dos fungos e com isso, pode-se observar diferenças no desenvolvimento das plantas tratadas. Assim como estudos de Liao et al., (2014), Sánchez-Rodríguez et al. (2018), Ahmada et al., (2020), Ramos et al., (2020), Wei et al. (2020), que confirmaram a presença de *B. bassiana* e *M. anisopliae* endofítico através da colonização da planta com o método pulverização foliar e também observaram influência positiva do endofítico em parâmetros agrônômicos das plantas estudadas.

No presente estudo, as respostas de incremento no crescimento das plantas de milho foram diferentes entre os isolados ESALQ 818 e LPPSP1. Foi observado um aumento significativo da altura de planta, comprimento de raiz e área foliar pelo isolado *B. bassiana* LPP SP1 até os 90 dias DPI, enquanto que o diâmetro de caule foi maior em plantas inoculadas por *M. anisopliae* ESALQ 818, em comparação com LPP SP1 e controle. Outros estudos também observaram variação no crescimento de plantas inoculadas por diferentes isolados do fungo do gênero *Metarhizium* (LIAO et al., 2014; LIRA et al., 2020).

A interação positiva entre fungo-planta, pode ocorrer por vários fatores e um deles, a existência de translocação de nutrientes entre planta e fungos entomopatogênicos (BEHIE et al., 2017). O incremento de biomassa e o crescimento vegetativo de plantas inoculadas pelo fungo pode ser dependente da disponibilidade de nutrientes do solo cultivado (TALL; MEYLING, 2018). Alguns estudos demonstram que *M. anisopliae* e *B. bassiana* na forma endofítica podem ser capazes de induzir a secreção de proteínas relacionadas à fotossíntese e ao estresse (AHMADA et al., 2019). Além de aumentar o acúmulo dos nutrientes como boro, cobre, fósforo, manganês e zinco disponível para a planta (ALVEZ et al., 2021) e também o aumento de alcaloides devido à síntese de metabólitos secundários (ESPINOSA et al., 2020). Adicionalmente, o crescimento das plantas colonizadas por *B. bassiana* pode ser desencadeado pelo aumento na biodisponibilidade de macro e micro nutrientes, tais como solubilização de fosfato, aumento da disponibilidade nitrogênio e aumento da concentração de cálcio (ZITLALPOPOCA-HERNANDEZ et al., 2017; PAL E GHOSH, 2018; BARRA-BUCAREI et al., 2020). Além da questão nutricional, estudos mostram que alguns fungos entomopatogênicos, como *M. anisopliae* e *B. bassiana* ainda são capazes de produzir e regular

hormônios de crescimento em plantas, como a auxina, citocinina, giberelina e etileno (BEHIE et al., 2017; LIAO et al., 2017; KRELL et al., 2018).

As espécies de fungos do gênero *Beauveria* e *Metarhizium* por serem frequentemente isolados do solo, possuem uma relação próxima com o ambiente terrestre (VEGA et al., 2018). Entretanto, as comunidades microbianas associadas à rizosfera são fortemente influenciadas por espécies de plantas e características do solo em um agroecossistema (SANCHEZ-FERNANDEZ et al., 2016). Assim, a presença de endofíticos pode variar em função dos estádios de crescimento da planta, local em que está cultivada e época do ano (TEHERAN-SIERRA et al., 2021). Variadas espécies de plantas fornecem diferentes recursos específicos como exsudatos de raízes, metabólitos e outros compostos benéficos associados à rizosfera (TIEMANN et al., 2015). Estima-se que, 80% dos microrganismos presentes na rizosfera produzem reguladores de crescimento vegetal com capacidade de regular vários processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas, através de alterações morfológicas e fisiológicas (BATISTA et al., 2018). Portanto, é notório que a associação fungo-planta é bastante vantajosa, pois nesta interação, os fungos auxiliam na mineralização, permitindo uma melhor absorção de nutrientes (DA SILVEIRA et al., 2019).

Resultados mostrados acima demonstram ser importantes, pois além dos fungos endofíticos promoverem controle de pragas, ainda estimulam o desenvolvimento das plantas. Entretanto, são necessários estudos sobre a relação fungos endofíticos e hospedeiros, pois os fungos endofíticos são um dos componentes mais importantes no agroecossistema, por possuir influência positiva no hospedeiro, promovendo tanto o desenvolvimento quanto proteção contra insetos e doenças (McKINNON et al., 2017; VEGA et al., 2018; TEHERAN-SIERRA et al., 2021).

5.4 Sobrevivência de larvas de *S. frugiperda* expostas a plantas de milho colonizadas endofiticamente com *M. anisopliae* ou *B. bassiana*

Larvas de *S. frugiperda* do 3º ínstar foram oferecidas folhas de milho inoculadas endofiticamente (via pulverização foliar) com os isolados ESALQ 818 e LPPSP1, os mais virulentos e mais aptos a colonizarem as plantas de acordo com os bioensaios de virulência e de colonização. A sobrevivência das larvas foi afetada pela exposição a folhas de milho colonizadas com os isolados fúngicos testados ($\chi^2 = 182,6$, $gl = 2$, $P < 0.0001$) (Figura 16). Larvas que foram expostas às folhas colonizadas por ESALQ 818 e LPPSP1, apresentaram

valores de sobrevivência de 3,6 e 4,8%, respectivamente depois de 3 dias de exposição, gerando um valor de S_{50} de 3 dias para os dois isolados. Aproximadamente 96% das larvas morreram até o 7º dia de avaliação, enquanto no tratamento controle a sobrevivência foi acima de 90%. Entretanto, não houve conidiogênese nos cadáveres das larvas mortas.

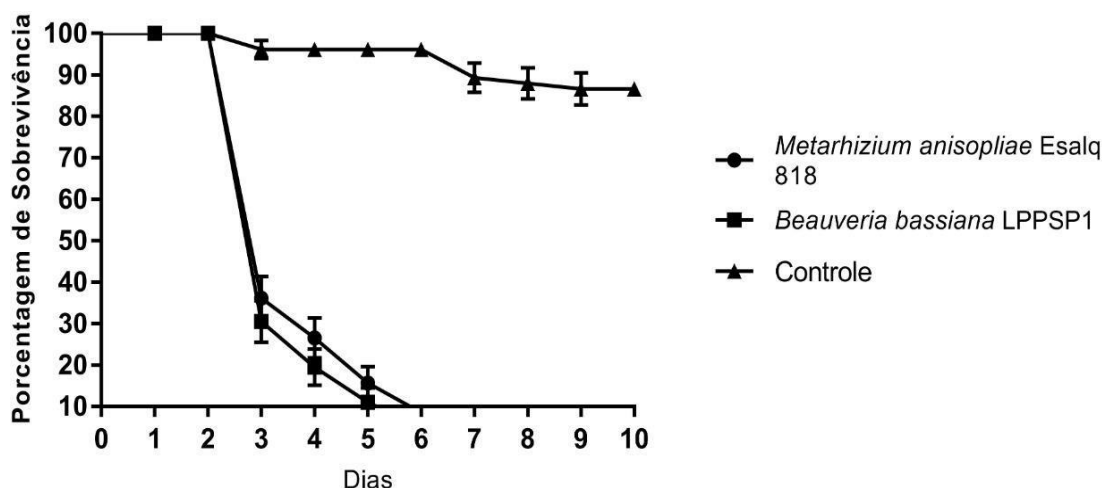


Figura 16. Sobrevivência de larvas de 3º instar de *S. frugiperda* após consumo de folhas de milho colonizadas endofiticamente pelos isolados *M. anisopliae* (ESALQ 818) e *B. bassiana* (LPPSP1). As plantas controles foram tratadas somente com Tween 80 (0,01%).

A utilização de fungos na forma endofítica através do método de pulverização foliar mostrou-se ser um potencial método de controle de *S. frugiperda*. As curvas de sobrevivência mostraram uma rápida mortalidade das larvas de *S. frugiperda* durante um período de 6 dias. Os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana* apresentaram eficácia semelhante em reduzir sobrevivência de *S. frugiperda*, tanto na forma endofítica, quanto via contato direto com os conídios diretamente nas larvas. Diversos estudos comprovam efeitos negativos na sobrevivência e no desenvolvimento de larvas de *S. frugiperda* alimentadas por plantas de milho colonizadas com *M. anisopliae* e *B. bassiana* endofíticos, utilizando métodos de inoculação de conídios via pulverização foliar e tratamento de sementes (RESQUÍN-ROMERO et al., 2016; LIRA et al., 2020; RAMOS et al., 2020; RUSSO et al., 2020; GUSTIANINGTYAS et al., 2021; HERLINDA et al., 2021).

Em nosso estudo, observou-se que as taxas de sobrevivência larval foram reduzidas rapidamente após a alimentação com folhas de milho colonizadas com os endófitos, com 50% dos insetos mortos no 3 dia de avaliação. Em comparações feitas através de observações visuais

das larvas do grupo controle com as que se alimentaram de folhas inoculadas com os fungos endofíticos, observou-se também que todas as larvas mortas nos bioensaios apresentavam uma diminuição no consumo de folhas de milho antes da morte, corpos menores (dados não apresentados) e com coloração preta (Figura 17). Esse resultado foi semelhante aos estudos de Gustianingtyas et al., (2021) e Herlinda et al., (2020b) que também utilizaram fungos endofíticos dos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* contra *S. frugiperda*, e perceberam que as larvas diminuíram o apetite, conseqüentemente resultando em perda de peso. De acordo com Mora et al., (2016), a diminuição de apetite das larvas pode ter sido causada pela a infecção pelos fungos através da ação de metabólitos secundários.



Figura 17. Virulência do fungo endofítico presente nas folhas quando oferecidas a lagartas de *S. frugiperda*. A) Lagarta sadia se alimentando com folha inoculada com fungo endofítico. B) Lagarta apresentando sintomas de infecção do fungo, após consumo de folha colonizada com fungo endofítico.

Outro resultado interessante observado foi que, quando colocadas em câmara úmida, as larvas mortas não apresentaram esporulação nos cadáveres. Nesse sentido, em que não houve esporulação dos fungos e as larvas se apresentaram na coloração preta, isso poderia ser um indicativo de que as toxinas ou enzimas secretadas nas plantas podem ter efeito negativo na fisiologia do inseto. Também, os fungos endofíticos poderia ter estimulado a planta a produzir compostos defensivos (VEGA et al., 2018). Em concordância com este estudo, Lira et al., (2020) ao oferecer folhas de milho inoculadas com isolados de *M. anisopliae* para larvas de *S. frugiperda*, também notou a ausência de conidiogênese em insetos mortos. Da mesma maneira, foi observado por Mahmood et al., (2019) a ausência de esporulação em *Sitobion avenae* (pulgão), após se alimentar da seiva de folhas de milho inoculadas com *B. bassiana*. Sanchez-

Rodriguez et al., (2018), ao oferecer folhas de trigo inoculadas com *B. bassiana* via pulverização foliar, não observaram conidiogênese em larvas de *Spodoptera littoralis* mortas.

Sabe-se pouco sobre como os fungos entomopatogênicos endofíticos atuam na morte de insetos (SILVA et al., 2020). Foram sugeridas várias possibilidades, porém, infecção por micose parece ser a menos provável (VEGA, 2018). Durante a infecção do inseto hospedeiro, toxinas fúngicas podem desempenhar um papel importante no processo de patogenicidade, (SAMUELS et al., 1988), assim como serem expressas durante a colonização endofítica, protegendo as plantas de insetos praga (CHRISTIAN et al., 2020). Vários trabalhos comprovaram a ação de toxinas secretadas pelos fungos entomopatogênicos na inibição da alimentação e na mortalidade dos insetos, tais como oosporeina, destruxina e beauvericina (RESQUÍN-ROMERO et al., 2016; GARRIDO-JURADO et al., 2017; AHMADA et al., 2019).

Embora essas toxinas possam ser detectadas em plantas colonizadas pelos fungos (ALLEGRUCCI et al. 2018), estudos mais detalhados sobre a produção de metabólitos secundários, assim como a indução do sistema de defesa da planta são necessários, pois não é conhecido a concentração necessária desses compostos para induzir efeito inseticida nas pragas.

Um outro fator que pode resultar em efeitos antagônicos em insetos praga é a indução de compostos de defesa de plantas, após a colonização de plantas por fungos endofíticos (VEGA, 2018). Neste trabalho, a ausência de conidiogênese do fungo nas larvas de *S. frugiperda* indica que é possível que a mortalidade pode ser resultado da interação do fungo com a planta e não por infecção das larvas depois da ingestão de fungos entomopatogênicos. Bucarei et al. (2020) comprovaram que isolados fúngicos endofíticos são capazes de atuar de forma sistêmica. Portanto, o mecanismo de ação poderia estar associado à produção de metabólitos secundários pelo fungo, ativação de defesas da planta ou uma combinação dos dois fatores. Em resposta ao ataque de patógenos/predadores, a planta produz compostos de rotas fisiológicas envolvidas na produção de enzimas que ativam seu sistema de defesa (LU et al., 2021).

Estudos de Shrivastava et al., (2015) relacionaram a diminuição de peso de larvas alimentadas com folhas de tomate colonizadas endofiticamente por *Beauveria*, com a alta síntese de terpenos, que é um metabólito secundário. Ainda existem os fitormônios que exercem função importante em rotas metabólicas relacionadas à indução de defesa de plantas em resposta a algum estresse causado pelo ataque de patógenos, tais como os ácidos salicílico e jasmônico (HU et al., 2021; LU et al., 2021). Ahmada et al., (2020), com o objetivo de avaliar o efeito da colonização endofítica de *M. robertsii* em plantas de milho, sobre o crescimento de milho, na expressão de genes de defesa e na mortalidade de *Agrotis ipsilon*, observaram que

houve mortalidade da lagarta, porém sem esporulação nos cadáveres, sugerindo então, que a mortalidade pode ter sido pela indução de defesa da planta, já que obtiveram como resultados, uma regulação positiva da via de biossíntese do ácido jasmônico (JA), lipoxigenase 1 e 12-oxo-fitodienoato redutase 7 (*opr7*) em tecido foliar de plantas cultivadas a partir de sementes inoculadas com *M. robertsii*.

O estudo atual comprova que isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, conseguem se estabelecer como endofíticos em plantas de milho através de pulverização foliar com suspensões de conídios e a colonização foi detectada de 7 a 90 dias DPI. Nesse sentido, a colonização de milho com fungos entomopatogênicos pode ser uma forma de controle de *S. frugiperda*, pois o fungo permanece atuando nas defesas das plantas e estimulando o desenvolvimento, desde os estádios iniciais até a fase reprodutiva do milho, período em que a praga ataca, causando sérios danos. Em geral, os endófitos tem uma vasta perspectiva de aplicação para uso como agentes de controle biológico em MIP. Embora este trabalho se mostrou eficiente nos bioensaios, ainda é necessário estudos para entender o mecanismo de interação molecular e bioquímica entre os fungos entomopatogênicos e planta (HU et al., 2021).

6 CONCLUSÕES

Ao testar dois isolados de *M. anisopliae* (ESALQ 818; LPP M1) e dois de *B. bassiana* (LPP 129; LPP SP1) com a finalidade de identificar os isolados mais virulentos a praga *S. frugiperda*, os isolados ESALQ 818, LPP SP1 se demonstraram mais virulentos e LPP129, mesmo tendo uma virulência mediana, ainda foi capaz de controlar a praga, e interferiu com o desenvolvimento da pupa.

Através da inoculação por pulverização foliar em plantas de milho, estabelecemos com sucesso a colonização dos dois isolados mais virulentos (LPP SP1 e ESALQ 818) como endofíticos. Notou-se maior colonização dos fungos em tecidos foliares e caulinares. A presença dos fungos nos tecidos, foram aumentando ao longo do tempo, persistindo na planta de milho até 90 dias DPI, momento em que a planta chegou em fase de florescimento (estádio R1).

Após a confirmação da colonização endofítica dos isolados mais virulentos, em milho, foram observadas diferenças nos parâmetros agrônômicos como o comprimento de raiz, diâmetro do caule, altura da planta, área foliar em que o fungo alterou o desenvolvimento das plantas, tornando-as maiores e mais bem desenvolvidas, comparando com as plantas sem tratamento. Além do crescimento das plantas, os fungos endofíticos ainda foram capazes de causar mortalidade de larvas de 3º instar de *S. frugiperda*, expostas as folhas inoculadas com os dois isolados, matando 50% das larvas em 3 dias.

Apesar de uma pequena diferença entre os isolados mais virulentos, o isolado LPP SP1, foi melhor em quesito de virulência, adaptação a planta após a inoculação e controle das larvas em forma endofítica. Dessa forma, a utilização de *B. bassiana* de modo endofítico em plantas de milho pode ser uma alternativa para redução dos danos de *S. frugiperda*. Contudo, ainda é necessário mais estudo sobre o tema, em busca de melhores metodologias de aplicação dos fungos endofíticos e sua interação com o agroecossistema, visando aplicação deste método inovador em programas de manejo de pragas em campo.

REFERÊNCIAS

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/portal/pag>. Acesso em: 20 jun. 2020.

AHMAD, I.; GIMENEZ-JASCO, M. D. M.; LUTHE, D. S.; SHAKEEL, S. N. Endophytic *Metarhizium robertsii* promotes maize growth, suppresses insect growth, and alters plant defense gene expression. **Biological control**, v. 144, p. 10416, 2020.

AKELLO, J.; SIKORA, R. Systemic acropetal influence of endophyte seed treatment on *Acyrtosiphon pisum* and *Aphis fabae* offspring development and reproductive fitness. **Biological control**, v. 61, n. 3, p. 215-221, 2012.

AKUTSE, K. S.; KIMEMIA, J. W.; EKESI, S.; KHAMIS, F. M.; OMBURA, O. L.; SUBRAMANIAN, S. Ovicidal effects of entomopathogenic fungal isolates on the invasive Fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Appl Entomol**, v. 143, n. 6, p. 626–634, 2019.

ALLEGRUCCI, N.; VELAZQUEZ, M. S.; RUSSO, M. L. Endophytic colonisation of tomato by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: the use of different inoculation techniques and their effects on the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **J PlantProt Res**, v. 1, p. 15–20, 2018.

ALMEIDA, A. M. B. **Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) e sua ação em inimigos naturais da praga**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho” (UNESP), Jaboticabal, 74f., 2009.

ALURAPPA, R., CHOWDAPPA, S., NARAYANASWAMY, R., SINNIHA, U.R., MOHANTY, S.K., SWAMY, M.K. Endophytic fungi and bioactive metabolites production: an update. *In: Microbial biotechnology*. Springer, Singapore, p. 455-482, 2018.

AMATUZZI, R. F.; CARDOSO, N.; POLTRONIERI, A. S.; POITEVIN, C. G.; DALZOTO, P.; ZAWADENEAKA, M. A.; PIMENTEL, I. C. Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae), **Braz. J. Biol.** V. 78, n. 3, p. 429-435, 2018.

ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina-PR, v. 31, n. 4, p. 945- 958, 2010.

ARTUZO, F. D.; FOGUESATTO, C. R.; SOUZA, A. R. L.; SILVA, L. X. Gestão de custos na produção de milho e soja. **Revista Brasileira de Gestão de Negócios**. São Paulo, v. 20, n.

2, 2018. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-48922018000200273. Acesso em: 01 jul. 2020.

ARUN, K. G.; ROBERT, A. A.; KANNAN, V. R. Exploration of endophytic microorganisms from selected medicinal plants and their control potential to multi drug resistant pathogens, **J. Med. Plants Stud.** v. 3, n. 2, p. 49-57, 2015.

BACCI, L.; DA SILVA, É. M.; MARTINS, J. C.; SOARES, M. A.; DE CAMPOS, M. R.; PICANÇO, M. C. Seasonal variation in natural mortality factors of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in open-field tomato cultivation. **J Appl Entomol.** v. 143, p. 21–33, 2019.

BARCELOS, P. H. S.; ANGELINI, M. R. Controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) em diferentes tecnologias Bt (*Bacillus thuringiensis*) na cultura do milho. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 5, n. 1, p. 35-40, jan./mar. 2018.

BARRA-BUCARI, L.; GONZÁLEZ, M. G.; IGLESIAS, A.F.; AGUAYO, G. S.; PENALOSA, M. G.; VERA, P. V. *Beauveria bassiana* multifunction as na endophyte: growth promotion and biologic of *Trialeurodes vaporariorum*, (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) in tomato. **Insects.** v. 11, p. 591, 2020.

BARROS, J. F. C.; CALADO, J. G. **A cultura do milho.** Évora, 2014. 52f. Material de apoio. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10174/10804>. Acesso em: 20 jun. 2020.

BATISTA, B. D.; LACAVALA, P. T.; FERRARI, A.; TEIXEIRA-SILVA, N. S.; BONATELLI, M. L.; TSUI, S.; MONDIN, M.; KITAJIMA, E. W. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth- promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, v. 206, p. 33–42, 2018.

BEHIE, S. W., BIDOCHKA, M. J. Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 80, n. 5, p. 1553-1560, 2014.

BERNARDI, D.; BERNARDI, O.; HORIKOSHI, R. J.; SALMERON, E.; OKUMA, D. M.; FARIAS, J. R.; NASCIMENTO, A.R.B.; OMOTO, C. Selection and characterization of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to MON 89034× TC1507× NK603 maize technology. **Crop Protection**, v. 94, p. 64-68, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.026>.

BIANCO, L.; PERROTA, G. Methodologies and perspectives of proteomics applied to filamentous fungi: from sample preparation to secretoma analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 5803-5820, 2015.

BRANINE, M.; BAZZICALUPO, A.; BRANCO, S. Biology and applications of endophytic insect-pathogenic fungi. **PLoSPathog.** v. 15, n. 1007831, 2019.

BROWNBRIDGE, M.; REAY, S. D.; NELSON, T. L.; GLARE, T. R. Persistence of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte following inoculation radiata pine seedlings. **Biological Control**, v. 61, p. 194-200, 2012. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2012.01.002.

BUENO, A. F.; CARVALHO, G. A.; SANTOS, A. C.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; SILVA, D. M. D. Pesticide selectivity to natural enemies: Challenges and constraints for research and field recommendation. **Ciência Rural**, v. 47, p. 1-10, 2017.

BUTT, T. M.; COATES, C. J.; DUBOVSKIY, I. M.; RATCLIFFE, I. N. Entomopathogenic fungi: new insights into host-pathogen interactions. **Adv. Genet.**, v. 94, p. 307-364, 2016.

CANASSA, F. et al. Effects of bean seed treatment by the entomopathogenic fungi *Metarhizium robertsii* and *Beauveria bassiana* on plant growth, spider mite populations and behavior of predatory mites. **Biological Control**, v. 132, p. 199-208, 2019.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento Da Safra Brasileira Grãos**. Monitoramento agrícola- Safra 2021/22, v. 7, n. 9, p. 1-31, jun. 2022.

CONCESCHI, M. R. **Parâmetros a serem considerados nas pulverizações do fungo *Isaria fumosorosea* para o manejo de *Diaphorina citri***. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

COSTA, V. H. D.; SOARES, A. M. F.; RODRIGUEZ, A. D.; ZANUNCIO, J. C.; SILVA, V.; VALICENTE, F. H. *Nomuraea rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 2, p. 796-798, 2015.

CRUZ-AVALOS, A. M.; BIVIÁN-HERNÁNDEZ, M. L. A.; IBARRA, J. E.; RICÓIN-CASTRO, M. A. High Virulence of Mexican Entomopathogenic Fungi Against Fall Armyworm, (Lepidoptera: Noctuidae), **Journal of Economic Entomology**, v. 112, n. 1, p. 99, 2019.

DA SILVEIRA, A. P. D.; IÓRIO, R. DE P. F.; MARCOS, F. C. C.; FERNANDES, A.O.; DE SOUZA, S. A. C. D.; KURAMAE, E. E.; CIPRIANO, M. A. P. Exploitation of new

endophytic bacteria and their ability to promote sugarcane growth and nitrogen nutrition. **Springer Netherlands**, v. 112, p. 283–295, 2019.

DAY, R.; ABRAHAMS, P.; BATEMAN, M.; BEALE, T.; CLOTTEY, V.; COCK, M.; COLMENAREZ, Y.; CORNIANI, N.; EARLY, R.; GODWIN, J.; GOMEZ, J.; MORENO, P. J.; MURPHY, S. T.; OPPONG-MENSAH, B.; PHIRI, N.; PRATT, C.; SILVESTRI, S.; WITT, A. Fall armyworm: impacts and implications for Africa. **Outlooks on Pest Manag**, v. 28, p. 196–201, 2017.

DIAS, P. M.; LOUREIRO, E. S. L.; PESSOA, L. G. A.; OLIVEIRA NETO, F. M.; TOSTA, R. A. S.; TEODORO, P. E. Interactions between Fungal-Infected *Helicoverpa armigera* and the Predator *Chrysoperla externa*. **Insects**, v. 10, n. 309, p. 1-11, 2019.

DUARTE, A. P.; KAPPES, C. Evolução dos sistemas de cultivo de milho no Brasil. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 152, p. 15-18, 2015.

DUNHAM, W. C. **Evolution and future of biocontrol. Paper presented at the 10th Annual Biocontrol Industry Meeting (ABIM)**, Basel, Switzerland, October 20th, 2015. Disponível em:
http://www.abim.ch/index.php?eID=tx_nawsecuredl&u=0&g=0&t=1489234639&hash=9a70d39f93f7e559c74c63844ae047a9aa3c37ea&file=fileadmin/abim/documents/presentations2015/Keynote_Dunham_ABIM_2015.pdf. Acesso em: 14 nov. 2020.

DUTTA, P.; KAUSHIK, H.; BHAWMICK, P.; PUZARI, K.; HAZARIKA, G. *Metarhizium anisopliae* as an endophyte has the ability to improve plant growth. **Int. J. Curr. Res.** v. 7, p. 14300-14304, 2015.

EL-GHANY, A. B. D.; MASRAHI, T. H.; MOHAMED, Y. S.; ABOUD, A., ALAWLAQI, A.; ELHUSSIENY, M. M. Maize (*Zea mays* L.) growth and metabolic dynamics with plant growth-promoting rhizobacteria under salt stresses. **Journal of Plant Pathology and Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 305, 2015.

ERLER, F.; ATES, A. O. Potential of two entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Coleoptera: Scarabaeidae), as biological control against the June beetle. **J. InsectSci.** v. 15, n. 1, p. 62, 2015.

ESPINOSA, D. J. L.; CUNHA, N. A.; RIVERA, S. I.; RICARDEZ, A. G. F.; CARVALHO, V. N.; DA SILVA, A. B.; DUARTE, R. T. Compatibilidade entre *Metarhizium anisopliae* e fungicidas registrados para a cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 23, n. 2, p. 180-187, 2020.

- FAGGION, A. **Níveis de ação no controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho.** 2017. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2017.
- FARIAS, J. R.; ANDOW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, D.; RIBEIRO, R. D. S.; NASCIMENTO, A. R.; SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Frequency of Cry1F resistance alleles in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n. 12, p. 2295-2302, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.4274>.
- FRANCIS, C. A.; RUTGER, J. N.; PALMER, A. F. E. A rapid method for plant leaf area estimation in maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, v. 9, n. 5, p. 537, 1969.
- FRONZA, E.; SPECHT, A.; HEINZEN, H. DE BARROS, N. M. *Metarhizium* (Nomuraea) *rileyi* as biological control agent. **Biocontrol Sci Technol**, v. 27, p. 1243–1264, 2017.
- GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola.** 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 2002.
- GALVÃO, J. C. C. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Revista Ceres**, v. 61, p. 819-828, 2014.
- GARCIA GUTIÉRREZ, C.; GONZÁLEZ MALDONADO, M. B. Uso de bioinsecticidas para el control de plagas de hortalizas en comunidades rurales. **Ra Ximhai**, v. 6, n.1, p.17- 22, 2010.
- GARCÍA, C.; BAUTISTA, N. A. Pathogenicity of isolates of entomopathogenic fungi against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Epilachnava rivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). **ColombEntomolRev**, v. 37, p. 217–222, 2011.
- GARRIDO-JURADO, I.; RESQUÍN-ROMERO, G.; AMARILLA, S. P.; RÍOS-MORENO, A.; CARRASCO, L.; QUESADA-MORAGA, E. Transient endophytic colonization of melon plants by entomopathogenic fungi after foliar application for the control of *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae). **J. Pest. Sci.**, v. 90, p. 319-330, 2017.
- GOLO, S. et al. Production of destruxins from *Metarhizium* spp. fungi in artificial medium and in endophytically colonized cowpea plants. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, PÁGINA???, 2014.
- GONZALEZ, F.; TKACZUK, C.; DINU, M.M.; FIEDLER, Z.; VIDAL, S.; ZCHORI-FEIN, E.; MESSELINK, G.J. New opportunities for the integration of microorganisms into biological pest control systems in greenhouse crops. **Journal of Pest Science**, v. 89, p. 295-311, 2016.

GOULART, M. M. P., BUENO, A. F., BUENO, R. C. O. F.; DINIZET, A. F. Host preference of the egg parasitoids *Telenomus remus* and *Thichogramma pretiosum* in laboratory. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 55, n. 1, p. 129-133, 2011.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. *Velvetbean caterpillar* (Lepidoptera: Noctuidae) rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, p. 487-488, 1976.

GREENFIELD, M.; GÓMEZ-JIMÉNEZ, M.I.; ORTIZ, V.; VEGA, F. E.; KRAMER, M.; PARSA, S. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. **Biological control**, v. 95, p. 40-48, 2016.

GUO, I.; WU, S.; ZHANG, F.; HUANG, C.; HE, K.; BABENDREIER, D.; WANG, Z. Prospects for microbial control of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: a review, **BioControl**, 2020. Doi: 10.1007/s10526-020-10031-0.

GURULINGAPPA, P.; SWORD, G. A.; MURDOCH, G.; MCGEE, P. A. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. **Biol. Control**, v. 55, p. 34-41, 2010.

GUSTIANINGTYAS, M.; HERLINDA, S.; SUWANDI, S. The endophytic fungi from South Sumatra (Indonesia) and their pathogenicity against the new invasive fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 22, n. 2, p. 1051-1062, 2021. DOI: 10.13057/biodiv/d220262.

HASEEB, M.; SRIVASTAVA, R. Potencial de fungos entomopatogênicos em pragas de insetos de manejo biológico. *In*: SHARMA (Ed.). **Controles biológicos para prevenir a deterioração dos alimentos: estratégias para a gestão pré e pós-colheita**, John Wiley y Sons Ltd., 2014, p. 163 – 182, 2014.

HERLINDA, S.; GUSTIANINGTYAS, M.; SUWANDI, S.; SUHARJO, R. Endophytic fungi confirmed as entomopathogens of the new invasive pest, the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), infesting maize in South Sumatra, Indonesia. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, p. 1-13, 2021. DOI: doi.org/10.1186/s41938-021-00470-x.

HORTA, A. B. et al. Toxinas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*, *In*: RESENDE, R. R. (Ed.), **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Fundamentos e Aplicações**. Blucher, São Paulo, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5151/9788521211150-21>. Acesso em: 19 jun. 2020.

HRUSKA, A. J. Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) management by smallholders. **CAB Ver.** v. 14, p. 1–11, 2019.

HU, S.; BIDOCHKA, M. J. Root colonization by endophytic insect-pathogenic fungi. **Journal of applied microbiology**, v. 130, n. 2, p. 570-581, 2021.

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

JABER, L. R. Grapevine leaf tissue colonization by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* and its effect against downy mildew. **Biol. Control**, v. 60, p. 103-112, 2015.

JABER, L. R., OWNLEY, B. H. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? **Biol. Control**, v. 116, p. 36–45, 2018.

JABER, L. R.; ENKERLI, J. Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. **Biol. Control**, Orlando, v. 103, p. 187-195, 2016.

KALVNADI, E.; MIRMOAYEDI, A.; ALIZADEH, A.; HAMID-REZA, P. Sub-lethal concentrations of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* increase fitness costs of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) offspring. **Journal of invertebrate pathology**, v. 158, p. 32-42, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.08.012>.

KAUSHIK, M.; MOORES, A. Nanocelluloses as versatile supports for metal nanoparticles and their applications in catalysis. **Green Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 622-637, 2016.

KEBEDE, M.; SHIMALIS, T. Out-break, distribution and management of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* JE smith in Africa: The status and prospects. **Acad Agric J.** v. 3, p. 551–568, 2018.

KEYSER, C. A.; THORUP-KRISTENSEN, Kr.; MEYLING, N. V. *Metarhizium* seed treatment mediates fungal dispersal via roots and induces infections in insects. **Fungal ecology**, v. 11, p. 122-131, 2014.

KHAN, A. L.; HAMAYUN, M; KHAN, S. A., KANG, S.; SHINWARI, Z. K.; KAMRAN, M.; REHMAN, S.; KIM, J.; LEE, I. Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1483-1494, 2012.

KRELL, V.; UNGER, S.; JAKOBS-SCHOENWANDT, D.; PATEL, A. V. Endophytic *Metarhizium brunneum* mitigates nutrient deficits in potato and improves plant productivity and vitality. **Fungal Ecology**, v. 34, p. 43-49, 2018.

LACEY, L. A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; FRUTOS, R.; BROWNBIDGE, M.; GOETTEL, M. S. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of invertebrate pathology**, v. 132, p. 1-41, 2015.

LIAO, X. et al. *Metarhizium robertsii* produces indole-3-acetic acid, which promotes root growth in Arabidopsis and enhances virulence to insects. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 163, n. 7, p. 980-991, 2017.

LIAO, X. et al. The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 16, p. 7089-7096, 2014.

LIRA, A. C.; MASCARIN, G. M.; JÚNIOR, Í. D. Microsclerotia production of *Metarhizium* spp. for dual role as plant biostimulant and control of *Spodoptera frugiperda* through corn seed coating. **Fungal Biology**, v. 124, n. 8, p. 689-699, 2020.

LOPES, R. B.; SOUZA, D. A.; ROCHA, L. F. N.; MONTALVA, C.; LUZ, C.; HUMBER, R. A.; FARIA, M. *Metarhizium alvesii* sp. nov.: a new member of the *Metarhizium anisopliae* species complex. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 151, p. 165-168, 2018.

LOPEZ, D. C.; SWORD, G. A. The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). **Biol. Control**, Orlando, v. 89, p. 53-60, 2015.

LOUREIRO, E. de S.; LIMA, A. R. de; PESSOA, L. G. A.; DIAS, P. M.; ADÃO, D. V.; ASSIS, L. F. Virulence of *Metarhizium rileyi* (Ascomycota: Clavicipitaceae) to *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae). **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. 1-17, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i7.3962. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/3962>. Acesso em: 15 jun. 2022.

LOUREIRO, E. S.; DIAS NETO, J. A.; PESSOA, L. G. A.; DIAS, P. M.; ADÃO, D. V.; YOKOTA, L. A. Effect of plant protection chemicals about the fungi *Trichoderma harzianum* and *Purpureocillium lilacinum*. **Research, society and Development**. v. 6, n. 6, 2020.

LU, H.; WEI, T.; LOU, H.; SHU, X.; CHEN, Q. A critical review on communication mechanism within plant-endophytic fungi interactions to cope with biotic and abiotic stresses. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 9, p. 719, 2021.

MACARIN, G. M.; JARONSKI, S. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal Microbiol Biotechnol** v. 32, n. 11, p. 1-26, 2016.

MAHMOOD, Z.; STEENBERGA, T.; MAHMOOD, K.; LABORIAUB, R.; KRISTENSENA, M. Endophytic *Beauveria bassiana* in maize affects survival and fecundity of the aphid *Sitobion avenae*. **Biological Control**, v. 137, p. 104017, 2019.

MAINA, U. M.; GALADIMA, I. B.; GAMBO, F. M.; ZAKARIA, D. A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 6, p. 27-32, 2018.

MALLAPUR, C. P.; NAIK, A. K.; HAGARI, S.; PRAVEEN, T.; PATIL, R. K.; LINGAPPA, S. Potentiality of *Nomuraearileyi* (Farlow) Samson against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) infesting maize. **J EntomolZool Stud**, v. 6, p. 1062–1067, 2018.

MANCILLAS-PAREDES, J. M., HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H., JARAMILLO-FLORES, M. E.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C. Proteases and Chitinases Induced in *Beauveria bassiana* during Infection by *Zabrotes subfasciatus*. **Southwestern Entomologist**, v. 44, n. 1, p. 125-137, 2019.

MANNINO, M. C.; HUARTE-BONNET, C.; DAVYT-COLO, B.; PEDRINI, N. Is the insect cuticle the only entry gate for fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 2, p. 33, 2019.

MANTZOUKAS, S.; CHONDROGIANNIS, C.; GRAMMATIKOPOULOS, G. Effects of three endophytic entomopathogens on sweet sorghum and on the larvae of the stalk borer *Sesamia nonagrioides*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 154, n. 1, p. 78-87, 2015.

MANTZOUKAS, S.; CHONDROGIANNIS, C.; GRAMMATIKOPOULOS, G. Effects of three endophytic entomopathogens on sweet sorghum and on the larvae of the stalk borer *Sesamia nonagrioides*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 154, n. 1, p. 78-87, 2015.

MARTÍNEZ, M. J. G. Evaluación de la patogenicidad y esporulación del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin cepa Metagreen en concentración de 1010 c/ml sobre adulto de Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*) en el Laboratorio de Hongos

Entomopatógenos del Campus Agropecuario de UNAN-León 2011-2012. 2014. Tesis - Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, Nicaragua.)

MARTINEZ-MEDINA, A.; FLORS, V.; HEIL, M. Recognizing plant defense priming. **Trends Plant Sci**, v. 21, n. 10, p. 818–822, 2016.

MC CORMICK, A.; REINECKE, A.; GERSHENZON, J. Feeding experience affects the behavioral response of polyphagous gypsy moth caterpillars to herbivore-induced poplar volatiles. **J Chem Ecol**, v. 42, n. 5, p.382–393, 2016.

MCKINNON, A. C.; SAARI, S.; MORAN-DIEZ, M. E.; MEYLING, N. V.; RAAD, M.; GLARE, T. R. *Beauveria bassiana* as an endophyte: a critical review of associated methodology and potential biocontrol. **BioControl**, v. 62, p. 1–17, 2017.

MEDO, J.; CAGAN, L. Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. **Biological Control**, Orlando, v. 59, p. 200- 208, 2011.

MICHEREFF FILHO, M.; FARIA, M.; WRAIGHT, S. P.; SILVA, K. F. A. S. Micoínseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas? **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, p.769-779, 2009.

MORA, M. A. E; ROUWS, C. R. J.; FRAGA, E. M. Occurrence of entomopathogenic fungi in Atlantic forest soils. **Microbiology Descubray**, v. 4, p. 2052-6180, 2016. DOI: <http://dx.doi.10.7243/2052-6180-4->.

MORAES, A. R. A.; LOURENÇÃO, A. L.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z. Resistência de híbridos de milho convencionais e isogênicos transgênicos a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bragantia**, Campinas, v.74, n. 1, p. 50-57, 2015.

MOURA, M. G. et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **J. Invertebr. Pathol**, v. 165, p. 46-53, 2019.

MUVEA, A. M.; R. MEYHOFFER, S.; SEVGAN, S.; POEHLING, H.; EKESI, S.; OLIVEIRA, D. G. P. et al. A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. **Journal of microbiological methods**, v. 119, p. 44-52, 2015.

NALIM, D. M. **Biologia, nutrição quantitativa e controle de qualidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais.** 1991. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Molecular genetics of *Beauveria bassiana* infection of insects. **Advances in Genetics**, v. 94, p. 165-249, 2016.

PAL, P.; GHOSH, A. Influence of TiO₂ nano-particles on charge carrier transport and cell performance of PMMA-LiClO₄ based nano-composite electrolytes. **Electrochimica Acta**, v. 260, p. 157-167, 2018.

PARNELL, J. J.; BERKA, R.; YOUNG, H. A.; STURINO, J. M.; KANG, Y.; BARNHART, D. M.; DILEO, M. V. From the lab to the farm: an industrial perspective of plant beneficial microorganisms. **Front Plant Sci**, v. 7, n. 1110, 2016. doi:10.3389/fpls.2016.01110.

PARRA, J. R. P. Biological control in Brazil: an overview. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 71, n. 5, out., 2014.

PARRA, J. R. P.; MILANO, P.; CONSOLI, F.; ZERIO, N.; HADAAD, M. Efeito da nutrição de adultos e da umidade na fecundidade de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, p. 49-57, 1999.

PARSA, S.; ORTIZ, V.; GOMEZ-JIMENEZ, M. I.; KRAMER, M.; VEGA F. E. Root environment is a key determinant of fungal entomopathogen endophytism following seed treatment in the common bean, *Phaseolus vulgaris*. **Biol. Control (in press)**, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.09.001>. Acesso em: 20 jun. 2020.

PARSA, S.; ORTIZ, V.; VEGA, F.E. Establishing Fungal Entomopathogens as Endophytes: Towards Endophytic Biological Control. **Journal of Visualized Experiments**, v. 74, p. 503-560, 2013.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer. 1991. p. 179–197. 1997.

PETRINI, O.; FISHER, P. J. Fungal endophytes in *Salicornia perennis*. **Trans. Br. Mycol. Soc.** v. 87, p. 647–651, 1986.

POGUE, M. Uma revisão mundial do gênero *Spodoptera* Gueneé (Lepidoptera: *Noctuidae*). **Memórias Am Entomol Soc**, v. 43, p.1–201, 2002.

POSADA, F.; AIME, M. C.; PETERSON, S. W.; REHNER, S. A.; VEJA, F. E. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). **Mycol. Res.** v.111, p. 748–757, 2007.

QU, S.; WANG, S. Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 83, p. 96-103, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.01.010>.

QUESADA- MORAGA, A. E. Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 136, p. 23–31, 2016.

RAJAB, L.; AHMAD, M.; GAZAL, I. Endophytic establishment of the fungal entomopathogen, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil., in cucumber plants. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, p. 1-7, 2020.

RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, D. SÁNCHEZ-PEÑA, S. Endophytic *Beauveria bassiana* in *Zea mays*: pathogenicity against larvae of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Southwestern Entomologist**. v. 41, p. 875–878, 2016.

RAMOS, Y.; TAIBO, A. D.; JIMÉNEZ, J. A.; PORTAL, O. Endophytic establishment of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in maize plants and its effect against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**. v. 20, n. 30, 2020.

RAMOS, Y.; TAIBO, A. D.; JIMÉNEZ, J. A.; PORTAL, O. Endophytic establishment of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in maize plants and its effect against *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, p. 1-6, 2020.

REDDY, K. R.; GANGATHULASI, J.; PARAKALLA, N. S.; HETTIARACHCHI, H.; BOGNER, J. E.; LAGIER. Compressibility and shear strength of municipal solid waste under short-term leachate recirculation operations. **Waste Management & Research**, v. 27, n. 6, p. 578-587, 2009.

RESEARCH AND MARKETS. **Global pesticides market segmented by type, application area and geography. Trends and forecasts (2015-2020)**. Sustainability, regulation & competition. 2016. Disponível em: http://www.researchandmarkets.com/research/4hd338/global_pesticides. Acesso em:10 nov. 2020.

RESQUÍN-ROMERO, G.; GARRIDO-JURADO, I; DELSO, C.; RÍOS-MORENO, A.; QUESADA- MORAGA, E. Transient endophytic colonizations of plants improve the

outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects. **J InvertebrPathol.** v. 136, p. 23–31, 2016.

RUSSO, L. M.; PELIZZA, S. A.; CABELLO, M. N.; STENGLEIN, S. A.; SCORSETTI, A. C. Screening of different inoculation techniques of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as an endophyte in plants of agricultural interest. **BiocontrolSci. Technol.** v.25, p. 475–480, 2015.

RUSSO, M. L.; PELIZZA, S. A.; VIANNA, M. F.; ALLEGRUCCI, N.; CABELLO, M. N.; TOLEDO, A. V.; SCORSETTI, A. C. Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) Merr. growth and yield. **Journal of King Saud University-Science**, v. 31, n. 4, p. 728-736, 2019.

RUSSO, M.; JABER, L.; SCORSETTI, A. C.; VIANNA, F.; CABELLO, M. Effect of entomopathogenic fungi introduced as corn endophytes on the development, reproduction, and food preference of the invasive fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pest Science**, v. 94, n. 3, p. 859-870, 2020.

SAFAVI, S. A.; SHAH, F. A.; PAKDEL, A. K.; RASOULIAN, G. R.; BANDANI, A. R.; BUTT, T. M. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 270, p. 116–123, 2017.

SAMUELS, R. I.; CHARNLEY, A. K.; REYNOLDS, S. E. The role of destruxins in the pathogenicity of three strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Mycopathologia**, 104:51–8, 1988.

SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, R. E. Antifungal volatile organic compounds from the endophyte *Nodulisporium sp.* strain GS4d2II1a: a qualitative change in the intraspecific and interspecific interactions with *Pythium aphanidermatum*. **Microbial ecology**, v. 71, n. 2, p. 347-364, 2016.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A. R.; RAYA-DÍAZ, S.; MARÍA ZAMARREÑO, A.; MARÍA GARCÍA-MINA, J.; DEL CAMPILLO, M. C.; QUESADA-MORAGA, E. An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae. **Biological Control**. v. 116, p. 90-102, 2018.

SARAIVA, K. R.; REBOUÇAS NETO, M. O.; FERNANDES, C. N. V.; MARQUES FILHO, F.; SILVA, F. S.; SALES, J. R. S. Efeitos de biofertilizante sobre o crescimento e a biomassa do milho agroecológico no Piauí, **Agrotropica**, v. 32, n. 1, p. 67-74. 2020.

SARMENTO, R. A.; AGUIAR, R. W. S.; AGUIAR, R. A. S. S.; VIEIRA, S. M. J.; OLIVEIRA, H. G.; HOLTZ, A. M. Revisão da Biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera*

frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Bioscience Journal**. v. 18, n. 2, p. 41-48, 2002.

SHRIVASTAVA, GITIKA et al. Colonization by arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi enhanced terpene production in tomato plants and their defense against a herbivorous insect. **Symbiosis**, v. 65, n. 2, p. 65-74, 2015.

SILVA, A. C. L.; SILVA, G. A.; ABIB, P. H. N.; CAROLINO, A. T.; SAMUELS, R. I. Endophytic colonization of tomato plants by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for controlling the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **CABI Agriculture and Bioscience**. v. 1, n. 3, 2020.

SILVA, L. B.; MAGGIONI, K.; FERREIRA, R. H.; SILVA, A. F.; PAVAN, B. E.; LOPES, G. N. Survival and nutritional indexes of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) maintained in Bt maize for five generations. **Rev. Bras. Cienc. Agrar.**, Recife, v. 14, n.2, p. 1-8, 2019.

SONG, Y.; CHEN, D.; LU, K. Enhanced tomato disease resistance primed by arbuscular mycorrhizal fungus. **Front Plant Sci**, v. 6, n. 786, p. 786, 2015.

SOUZA, M. L.; SANCHES, A. M. M.; DE SOUZA, A. D. A.; FARIA, A. M.; ESPINEL-CORREAL, C.; SIHLER, W.; LOPES, R. B. Within-host interactions of *Metarhizium rileyi* strains and nucleopolyhedroviruses in *Spodoptera frugiperda* and *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **J InvertebrPathol**, v. 162, p. 10–18, 2019.

SOUZA, T. D.; FERNANDES, F. O.; SANCHES, A. C.; POLANCZYK, R. A. Sublethal effects of different fungal isolates on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 141, p. 1-12, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00327-9>.

TALL, S.; MEYLING, N. V. Probiotics for plants? Growth promotion by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* depends on nutrient availability. **Microbial Ecology**, v. 76, n. 4, p. 1002-1008, 2018.

TEHERAN-SIERRA, L. G.; FUNNICELLI, M. I. G.; DE CARVALHO, L. A. L.; FERRO, M. I. T.; SOARES, M. A.; PINHEIRO, D. G. Bacterial communities associated with sugarcane under different agricultural management exhibit a diversity of plant growth-promoting traits and evidence of synergistic effect. **Microbiological Research**, v. 247, p. 126729, 2021.

TIEMANN, L. K.; GRANDY, A. S.; ATKINSON, E. E.; MARIN-SPIOTTA, E.; MCDANIEL, M. D. Crop rotational diversity enhances belowground communities and functions in an agroecosystem. **Ecology letters**, v. 18, n. 8, p. 761-771, 2015.

ULRICH, K.; ULRICH, A.; EWALD, D. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions, FEMS. **Microbiol. Ecol.** v. 63, p. 169-180, 2008.

USDA. **World agricultural production**. 2022. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/world-agricultural-production>. Acesso em: 20 jun. 2022.

VAN LENTEREN, J. C.; BOLCKMANS, K.; KÖHL, J. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **Bio Control**. v. 63, p. 39–59, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>.

VEGA, F. Insect pathology and fungal endophytes. **J Invertebr Pathol**, v. 98, n. 3, p. 277–279, 2008.

VEGA, F. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. **Mycologia**, v. 110, n. 1, p. 4–30, 2018.

VIRLA, E.; ALVAREZ, A.; LOTO, F.; PERA, M.; BAIGORÍ, M. Cepas de verme do exército (Lepidoptera: Noctuidae) na Argentina, suas plantas hospedeiras associadas e resposta a diferentes fatores de mortalidade em laboratório. **Fla Entomol**, v. 91, p. 63–69, 2008.

WEI, Q. Y.; LI, Y. Y.; XU, C. Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* increases the resistance of tomatoes against *Bemisia tabaci*. **Arthropod-Plant Interactions**. v. 14, p. 289–300, 2020.

WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, v. 73, n. 2, p. 274–276, 1995.

ZITLALPOPOCA-HERNANDEZ, G.; NAJERA-RINCON, M. B.; DEL-VAL, E. K.; ALARCON, A.; JACKSON, T.; LARSEN, J. Multitrophic interactions between maize mycorrhizas, the root feeding insect *Phyllophaga vetula* and the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied Soil Ecology**, v. 115, p. 38-43, 2017.