

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

DYLAN THOMAS TELLES AMANDIO

Avaliação de isolados de *Metarhizium* spp. (Ascomycota: Hypocreales) nativos de Santa Catarina na promoção de crescimento de gramíneas (Poacea) forrageiras e antagonismo a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Florianópolis

2022

Dylan Thomas Telles Amandio

Avaliação de isolados de *Metarhizium* spp. (Ascomycota: Hypocreales) nativos de Santa Catarina na promoção de crescimento de gramíneas (Poacea) forrageiras e antagonismo a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Dissertação submetida ao Programa de pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Alex Sandro Poltronieri

Coorientador: Prof. Dr. Leandro do Prado Ribeiro

Florianópolis 2022

Ficha de identificação da obra

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Amandio, Dylan Thomas Telles

Avaliação de isolados de *Metarhizium* spp. (Ascomycota: Hypocreales) nativos de Santa Catarina na promoção de crescimento de gramíneas (Poacea) forrageiras e antagonismo a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) / Dylan Thomas Telles Amandio ; orientador, Alex Sandro Poltronieri, coorientador, Leandro do Prado Ribeiro, 2022.
123 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Controle biológico. 3. Sistema planta-fungo. 4. Fungos entomopatogênicos. 5. Forragicultura. I. Poltronieri, Alex Sandro . II. Ribeiro, Leandro do Prado. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

Dylan Thomas Telles Amandio

Avaliação de isolados de *Metarhizium* spp. (Ascomycota: Hypocreales) nativos de Santa Catarina na promoção de crescimento de gramíneas (Poacea) forrageiras e antagonismo a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

O presente trabalho em nível de mestrado será avaliado pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra.: Cristiane Nardi
Instituição: Universidade Estadual do Centro Oeste

Prof. Dr.: Robson Marcelo di Piero
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr.: Daniel Bernardi
Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra: Márcia Regina Fanta
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em ciências

Coordenador do programa de pós-graduação

Professor Alex Sandro Poltronieri, Dr. Orientador

Florianópolis, 2022

**Sou um pouco de todos que conheci,
um pouco dos lugares que fui,
um pouco das saudades que deixei
e sou muito das coisas que gostei.**

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

O ataque de pragas é uma das principais causas da redução da produtividade de pastagens, podendo, ainda, acelerar seu processo de degradação. A mitigação dos danos ocasionados por artrópodes-praga é realizada com inseticidas/acaricidas sintéticos, com impacto negativo ao agroecossistema, saúde dos agricultores e consumidores, especialmente pela possibilidade de permanência de resíduos nos produtos agroalimentares. Sendo assim, novas alternativas têm sido estudadas e empregadas a fim de reduzir o impacto do ataque de artrópodes e aumentar a produtividade dos sistemas pastoris. Dentre essas, o emprego de fungos entomopatogênicos como agentes de controle biológico tem se mostrado uma opção promissora e economicamente viável. Além disso, estudos recentes têm verificado que esses fungos podem ser úteis não apenas como agentes de controle biológico aplicado (biopesticidas), mas também por meio da colonização endofítica de culturas agrícolas, induzindo seu crescimento e promovendo a supressão de agentes bióticos causadores de dano. Dessa forma, o presente projeto tem como objetivo avaliar a ação promotora de crescimento e o potencial para controle de pragas que possuem isolados de *Metarhizium* spp. nativos de Santa Catarina, em gramíneas (Poaceae) forrageiras. Para isso, os isolados foram inoculados nas plantas pelo tratamento de sementes, tratamento de solo (soil drench) e imersão das raízes de mudas. A avaliação dos efeitos da colonização endofítica sobre o crescimento vegetal foi realizada por meio da análise de parâmetros vegetativos e teores de pigmentos fotossintéticos. Já o efeito sobre a biologia de insetos, foi quantificado através de testes de consumo foliar, preferência na oviposição e desempenho biológico de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com plantas colonizadas. Os resultados demonstraram que a ação dos isolados é espécie-específica, tendo seus efeitos mediados a partir da espécie da planta. Alguns dos genótipos fúngicos testados possuem boa ação promotora de crescimento, capazes de aumentar significativamente a biomassa vegetal de plantas inoculadas com seus conídios, sendo candidatos promissores para o desenvolvimento de novos inoculantes biológicos. Além disso, foi verificado que a presença endofítica do *Metarhizium anisopliae* possui ação antagonista a lagartas de *Spodoptera frugiperda* que se alimentaram de plantas colonizadas. Os isolados endofíticos foram capazes de reduzir o potencial biótico, ocasionar elevada mortalidade e prejudicar parâmetros reprodutivos da população da praga. Sendo assim, esse trabalho avança no conhecimento das relações inter-específicas que o *M. anisopliae* estabelece com as plantas inoculadas, ajudando a elucidar os potenciais efeitos da aplicação de micopesticidas em áreas de pastagens, seu espectro de atividades, benefícios ao MIP e ao agroecossistema. A partir das análises realizadas, foi possível obter isolados de *Metarhizium* spp. nativos de Santa Catarina com múltiplos espectros de ação e potencial na geração de novos produtos biológicos a serem ofertados ao mercado.

Palavras-chave: Fungos endofíticos; entomopatógenos; pastagens; protocooperação.

ABSTRACT

The attack of pests is one of the main causes of the reduction of pasture productivity and can also accelerate its degradation process. The mitigation of damage caused by arthropod pests is carried out with synthetic insecticides/acaricides, with a negative impact on the agroecosystem, the health of farmers and consumers, especially due to the possibility of residues remaining in agrifood products. Therefore, new alternatives have been studied and used in order to reduce the impact of arthropod attacks and increase the productivity of pastoral systems. Among these, the use of entomopathogenic fungi as biological control agents has shown to be a promising and economically viable option. Furthermore, recent studies have verified that these fungi can be useful not only as applied biological control agents (biopesticides), but also through the endophytic colonization of agricultural crops, inducing their growth and promoting the suppression of harmful biotic agents. Thus, the present project aims to evaluate the growth promoting action and the potential for pest control that have *Metarhizium* spp. natives of Santa Catarina, in forage grasses (Poaceae). For this, the isolates were inoculated in the plants by seed treatment, soil treatment (soil drench) and immersion of seedling roots. The evaluation of the effects of endophytic colonization on plant growth was performed through the analysis of vegetative parameters and levels of photosynthetic pigments. The effect on insect biology was quantified through tests of foliar consumption, oviposition preference and biological performance of *Spodoptera frugiperda* fed with colonized plants. The results showed that the action of the isolates is species-specific, having its effects mediated from the plant species. Some of the fungal genotypes tested have good growth promoting action, capable of significantly increasing the plant biomass of plants inoculated with their conidia, being promising candidates for the development of new biological inoculants. In addition, it was verified that the endophytic presence of *Metarhizium anisopliae* has antagonistic action against *Spodoptera frugiperda* caterpillars that fed on colonized plants. The endophytic isolates were able to reduce the biotic potential, provide high mortalities and harm reproductive parameters of the pest population. Therefore, this work advances the knowledge of the inter-specific relationships that *M. anisopliae* establishes with the inoculated plants, helping to elucidate the potential effects of the application of mycopesticides in pasture areas, its spectrum of activities, benefits to IPM and to the agroecosystem. From the analyzes carried out, it was possible to obtain isolates of *Metarhizium* spp. natives of Santa Catarina with multiple spectrums of action and potential in the generation of new biological products to be offered to the market.

Keywords: Endophytic fungi; entomopathogens; pastures; proto cooperation.

SUMÁRIO

Capítulo 11

Referencial teórico

1	Introdução.....	11
1.2	Revisão bibliográfica.....	12
1.2.1	Pastagens no Brasil.....	12
1.2.2	Manejo de pragas em áreas de pastagens	13
1.2.3	Fungos entomopatogênicos	14
1.2.4	O gênero <i>Metarhizium</i> spp.	16
1.2.5	Fungos entomopatogênicos endofíticos	17
1.2.6	Fungos endofíticos promotores de crescimento vegetal.....	17
1.2.7	Fungos entomopatogênicos endofíticos e sua efetividade no manejo de pragas e doenças	19
1.3	Objetivos	20
1.3.1	Objetivo Geral	20
1.3.2	Objetivos Específicos	20
1.4	Referências	21

Capítulo 2

Fungos entomopatogênicos endofíticos como promotores de crescimento de *Urochloa brizantha*: potencial como inoculante de sementes

2.1	Resumo.....	29
2.2	Abstract	30
2.3	Introdução.....	31
2.4	Material e métodos	32
2.4.1	Isolados de <i>Metarhizium</i> spp.....	32
2.4.2	Planta forrageira: obtenção e multiplicação	35
2.4.3	Obtenção dos conídios e preparo das suspensões	35
2.4.4	Inoculação dos isolados fúngicos em sementes de <i>Urochloa brizantha</i>	36
2.4.5	Efeito dos isolados de <i>Metarhizium</i> spp. em parâmetros do crescimento de <i>Urochloa brizantha</i>	37
2.4.6	Quantificação do teor de pigmentos fotossintéticos das plantas inoculadas	37
2.4.7	Quantificação do teor de macro e micronutrientes das plantas inoculadas	38
2.4.8	Confirmação do processo de colonização endofítica	38
2.4.9	Persistência e produção de conídios dos isolados fúngicos no substrato	40
2.4.10	Efeito de isolados de <i>Metarhizium</i> spp. na germinação de sementes de <i>Urochloa brizantha</i>	42
2.4.11	Análise dos dados	43

2.5	Resultados	44
2.5.1	Efeito de isolados de <i>Metarhizium</i> spp. em parâmetros do crescimento de <i>Urochloa brizantha</i>	44
2.5.2	Similaridade na composição química e nos teores de pigmentos fotossintéticos e relação com parâmetros do crescimento de plantas inoculadas de <i>Urochloa brizantha</i>	47
2.5.3	Colonização endofítica e recuperação dos isolados selecionados a partir do substrato	50
2.6	Discussão.....	53
Capítulo 3		
Efeito da inoculação de isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ascomycota: Claviptaceae) no desenvolvimento vegetal de mudas de gramíneas forrageiras		
3.1	Resumo	62
3.2	Abstract	63
3.3	Introdução.....	64
3.4	Material e métodos	65
3.4.1	Isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	65
3.4.2	Plantas forrageiras.....	65
3.4.3	Obtenção dos conídios e preparo das suspensões.	66
3.4.4	Inoculação dos isolados fúngicos e ação promotora de crescimento nas mudas de forrageiras.....	67
3.4.5	Confirmação da colonização endofítica pelo isolados fúngicos	69
3.4.6	Persistência e produção de conídios dos isolados no substrato.....	70
3.4.7	Análise dos dados	71
3.5	Resultados	72
3.5.1	Efeito de isolados de <i>Metarhizium</i> spp. no desenvolvimento das plantas forrageiras	72
3.5.2	Teores de pigmentos fotossintéticos das gramíneas <i>Axonopus catharinensis</i> cv. scs 315 Catarina gigante (missioneira) e <i>Cynodon dactylon</i> cv. Tifton 85 sob influência dos diferentes isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	81
3.5.3	Colonização endofítica e recuperação do substrato dos isolados selecionados	82
3.6	Discussão.....	85
3.7	Referências	90
Capítulo 4		
Efeito antagônico de isolados endofíticos de <i>Metarhizium anisopliae</i> no desenvolvimento, reprodução e seleção de hospedeiros de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae)		
4.1	Resumo	94
4.2	Abstract	95
4.3	Introdução.....	96
4.4	Materiais e métodos.....	97

4.4.1	Plantas forrageiras.....	97
4.4.2	Insetos.....	98
4.4.3	Isolados de <i>M. anisopliae</i> : origem, multiplicação, preparação das suspensões e inoculação nas plantas.....	98
4.4.4	Bioensaios	99
4.4.4.1	Efeito sobre parâmetros biológicos de <i>Spodoptera frugiperda</i>	100
4.4.4.2.	Efeito no consumo foliar de <i>Spodoptera frugiperda</i>	101
4.4.4.3.	Efeito na preferência de oviposição de <i>Spodoptera frugiperda</i>	103
4.4.4.4	Confirmação da colonização endofítica	105
4.4.5	Análise dos dados.....	105
4.5	Resultados	106
4.6	Discussão.....	114
4.7	Referências	117

CAPÍTULO 1

Referencial teórico

1 INTRODUÇÃO

A produção de leite/carne à base de pasto é amplamente difundida e utilizada no Brasil. O país possui condições privilegiadas para a produção de gramíneas forrageiras, cultivadas em uma ampla extensão territorial. Segundo o IBGE (2017), aproximadamente 112 milhões de hectares são destinados a produção de pastagens cultivadas, dos quais 85% é composto por *Urochloa* spp., de diferentes cultivares (Macedo, 2006). Apesar da importância para a produção de alimentos, estima-se que mais de 50% das áreas de pastagens apresentem algum processo de degradação (Barbieri e Ferés, 2021). A degradação é ocasionada por fatores diversos, como baixa fertilidade do solo, escolha de espécies inadequadas e superlotação de animais (Muller et al., 2004; Pereira et al., 2018). Esse decréscimo na capacidade de suporte é acompanhado por problemas secundários atrelados ao processo de degradação, como uma maior incidência de pragas e agentes causadores de doenças. Tais organismos são favorecidos pela perda de vigor e capacidade de recuperação natural das gramíneas, dificultando ainda mais a consolidação, o crescimento e a obtenção de maiores rentabilidades desses sistemas (Lovatto e Ribeiro, 2017).

Algumas técnicas têm sido utilizadas a fim de eliminar ou atenuar os efeitos ocasionados por insetos-praga. Entre as estratégias utilizadas, destaca-se a aplicação de inseticidas sintéticos e controle microbiano com fungos entomopatogênicos (Hohlenwerger, 2016). O controle químico é umas das formas mais empregadas para manejo de pragas em diferentes culturas, entretanto, possui limitações relacionadas aos seus custos, a saúde dos aplicadores e ao meio ambiente (Mahmood et al., 2016). Além disso, oferecem riscos pela seleção de populações resistentes aos seus princípios ativos e necessitam de um período de carência e de reentrada na área aplicada (Karuppaiah et al., 2017; Rembischevski e Caldas, 2018).

A utilização de inimigos naturais, como os fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium* (Ascomycota: Hypocreales), para o manejo de pragas em pastagens já é uma realidade (Carvalho et al., 2019; Mudronceková et al., 2019). A aplicação direta de conídios é capaz de eliminar alguns dos principais insetos-praga que atacam gramíneas forrageiras (Auad e Silva, 2019), como o complexo de cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae). Entretanto, a aplicação direta de conídios apresenta entraves relacionados com sua biologia, uma vez que estes

são sensíveis a condições ambientais. Temperaturas elevadas, radiação ultravioleta e baixa umidade relativa influenciam negativamente na germinação de conídios, mesmo em bioinseticidas formulados (Lira et al., 2020). Desse modo, a triagem e seleção de isolados entomopatogênicos nativos é interessante aos programas de manejo integrado de pragas locais, devido a possibilidade de obtenção de cepas adaptadas as condições edafoclimáticas da região (Revisados por Jaber e Owley, 2018), possibilitando a elaboração de inseticidas microbianos mais efetivos.

Estudos recentes demonstraram que muitos fungos entomopatogênicos, até então considerados apenas como parasitas de insetos, possuem outras relações interespecíficas nos agroecossistemas. Estes organismos são capazes de viver endofiticamente em plantas (Jaber e Enkerli, 2017; Vega, 2018), desempenhando funções positivas em seu desenvolvimento, sendo capazes de aumentar a produtividade de diversas culturas (Sánchez-Rodríguez et al., 2017; Donga et al., 2018; Lira et al., 2020). Essa relação endofítica tem revelado um grande potencial de aplicação na agricultura, podendo promover o crescimento vegetal, colonizar a rizosfera e ainda funcionar como antagonistas de fitopatógenos e artrópodes-praga (Jaber e Ownley, 2018). Os efeitos da colonização endofítica do gênero *Metarhizium* spp. em culturas agrícolas foi promissor em diversos bioensaios realizados no Brasil e no mundo (Jaber e Owley, 2018). No entanto, inexistem trabalhos que avaliem sua relação com gramíneas forrageiras amplamente utilizadas em sistemas de produção à base de pastagens. Dessa forma, visando contribuir para um dos agroecossistemas de maior importância no Brasil, o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial promotor de crescimento de 14 isolados nativos e 2 comerciais de *Metarhizium* spp. em 4 espécies de gramíneas forrageiras. Os isolados que proporcionarem os melhores resultados na promoção de crescimento destas espécies vegetais serão utilizados como modelo para dimensionar o efeito antagonista que sua presença endofítica ocasiona em indivíduos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentados com folhas de plantas colonizadas.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Pastagens no Brasil

Em meados de 1500, apenas 9% da cobertura original do Brasil era ocupada por formações campestres (Magnanini, 1961; Rocha, 1988). Com a drástica modificação do uso do solo promovida pela exploração do território que se seguiu, as áreas de pastagens passaram a ocupar aproximadamente 21% do território nacional, representando 40% das terras agricultáveis (Lapig,

2017; Embrapa, 2018). Estas áreas são utilizadas para criação de bovinos visando a obtenção de carne e leite, destinados ao abastecimento do mercado interno e exportação. A produção animal extensiva baseada em pastagens perenes caracteriza a bovinocultura brasileira, que possui um dos menores custos (US\$) por quilo de carne produzida e o maior rebanho bovino comercial do planeta (Carvalho, 2009; Dias-Filho, 2014; USDA, 2022). A respeito da área ocupada, segundo o censo agropecuário (IBGE, 2017), o Brasil possui aproximadamente 47 milhões de hectares de pastagens naturais e quase 200 milhões ha de cultivadas, no qual mais da metade é composto por diferentes cultivares de *Urochloa* sp, representando a monocultura mais extensa do mundo (Jank et al., 2014).

Apesar da importância para a economia nacional, estima-se que 50 a 70% das áreas de pastagens do país estejam em processo de degradação (Galdino et al., 2016). Tal processo é um fenômeno mundial que acomete aproximadamente 20% das pastagens nativas ou plantadas ao redor do mundo, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical (Muller et al., 2004; Aguiar et al., 2017). No Brasil, pastagens degradadas ocorrem em todas as macrorregiões, com maior incidência nas fronteiras agrícolas do Norte, onde a pecuária vem apresentando altas taxas de crescimento (Dias-Filho, 2014). Esse cenário, atrelado a necessidade de tornar a produção animal mais sustentável, tem gerado diversas demandas para o desenvolvimento de novas técnicas que tornem a produção mais eficiente (Jank et al., 2014).

A redução drástica na capacidade de suporte de pastagens está associada a diferentes causas complementares, que reduzem consideravelmente a produtividade do pasto e, por consequência, dos animais que dele se alimentam (Lovatto e Ribeiro, 2017). Práticas inadequadas de manejo são apontadas como aceleradoras da degradação destes agroecossistemas e englobam desde a adubação insuficiente até o sobrepastejo (Dias-Filho, 2014). Essas causas acabam por esgotar a capacidade de rebrote das plantas desejadas, tornando-as deficientes e mais suscetíveis ao ataque de insetos-praga, tidos como os principais problemas bióticos destes agroecossistemas (Gusmão et al., 2016; Schoebel e Carvalho, 2020; Congio et al., 2020).

1.2.2 Manejo de pragas em áreas de pastagens

A mitigação dos danos ocasionados por insetos-praga em áreas de pastagens centrou-se historicamente na aplicação de produtos químicos inseticidas, com amplo espectro de ação (Ferguson e Peoples, 2013; Rembischevski e Caldas, 2018). Entretanto, o uso destes produtos pode trazer diversos inconvenientes, como a necessidade de retirada dos animais das áreas tratadas durante o período de carência. Assim, tornam-se necessárias áreas adjacentes para a permanência

do rebanho, o que não é possível em muitas propriedades familiares produtoras de leite (Sartor e Golvea, 2009).

Diversas medidas alternativas vêm sendo empregadas em áreas pastoris com o objetivo de reduzir os impactos gerados pela herbivoria de insetos-praga. Dentre as opções, destaca-se a utilização de resistência varietal e controle microbiano através de fungos entomopatogênicos (Lovatto e Ribeiro, 2017). Isso se deve ao baixo custo, facilidade de aplicação, compatibilidade com outras estratégias de controle e, principalmente, a ausência de um intervalo de segurança, dispensando a retirada dos animais das áreas aplicadas (Sartor e Golvea, 2009; Jaber e Ownley, 2017).

Existem diversas espécies de insetos capazes de ocasionar danos às gramíneas (Poaceae) forrageiras, amplamente, destacando-se populações de lagartas desfolhadoras, como *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e, principalmente, as diferentes espécies de cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae) (Sartor e Golvea, 2009). Por isso, a manutenção da sanidade do pasto é considerada complexa, visto que existem simultaneamente diversas espécies de pragas ocasionando distintos tipos de danos às plantas, que podem apresentar diferentes níveis de suscetibilidade aos métodos de controle aplicados. O emprego de inseticidas microbianos, com ênfase para os formulados com *M. anisopliae* utilizados no controle de cigarrinhas-das-pastagens, vem se mostrando promissores em áreas de pastagens e cana-de-açúcar (Lovatto e Ribeiro, 2017; Pitta et al., 2019), consistindo, atualmente, em uma das principais ferramentas para o manejo desse complexo de insetos-praga. Dessa forma, conhecer as interações desses organismos com outros insetos-praga de importância econômica e com as plantas forrageiras é importante para elucidar os potenciais efeitos da aplicação de micopesticidas em áreas de pastagens, seu espectro de atividades, benefícios ao MIP e ao agroecossistema.

1.2.3 Fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos são agentes etiológicos responsáveis por aproximadamente 80% das doenças que acometem os artrópodes, sendo que esse grupo de microrganismos agrega cerca de 100 gêneros e mais de 700 espécies descritas (Mascarin e Pauli, 2015). Algumas espécies de fungos entomopatogênicos vêm sendo estudadas devido ao seu potencial para suprimir populações de insetos-praga, especialmente para aplicação em programas de controle biológico aplicado. MicoInseticidas formulados são uma alternativa viável aos inseticidas sintéticos e uma ferramenta promissora para programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Nava-Pérez et al.,

2012). Sua utilização na agricultura tem sido realizada com êxito em diversas culturas de interesse agrícola, como café para o manejo de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), *Citrus* para o manejo de *Orthezia praelonga* (Douglas) (Hemiptera: Ortheziidae), cana-de-açúcar e pastagens para o manejo do complexo de cigarrinhas (Hemiptera: Cercopidae), além de outras espécies-praga de importância econômica para diversas culturas agrícolas (Belay e tenkegna, 2017; Weiler et al., 2017).

No Brasil, conídios ou blastosporos de algumas espécies de fungos entomopatogênicos têm sido utilizados para formulação de bioinseticidas, existindo atualmente, diversas marcas comerciais formuladas, com destaque para as formuladas com conídios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) (Mascarin e Pauli, 2015). A América do Sul é líder na utilização desses microrganismos como agentes de controle biológico, concentrando 42,7% desses bioinseticidas (Mascarin e Pauli, 2015; Mora et al., 2016). As razões desse sucesso se devem as condições de temperatura e umidade favoráveis para o desenvolvimento de epizootias no campo, especialmente em áreas agrícolas. Apesar de serem eficientes a nível nacional, a busca por isolados regionais é desejável, tendo em vista a grande heterogeneidade das condições edafoclimáticas do Brasil, que podem representar limitações para alguns genótipos pouco adaptados. A região Sul do país não possui nenhum produto comercial elaborado com fungos entomopatogênicos autóctones, o que pode ter alguma influência negativa no desempenho destes microrganismos em condições de campo.

Os fungos entomopatogênicos se destacam em relação a outros produtos fitossanitários devido a sua facilidade de produção massal em meios alternativos, compatibilidade com outros métodos de controle, segurança para os trabalhadores e ausência de período de carência (Lacey e Kaya, 2007). Em relação a sua efetividade, esses fungos são capazes de infectar todos os estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, com exceção dos ovos. Além de não necessitarem que o inseto se alimente de substratos contaminados com conídios, uma vez que estes agem por contato, penetrando a cutícula dos artrópodes e iniciando a infecção de forma percutânea (Zimmermann, 2007). Ademais, vêm ganhando cada vez mais destaque os estudos que abordam as relações de fungos entomopatogênicos com outros agentes bióticos nos agroecossistemas, como a capacidade de colonizar endofiticamente plantas nativas e cultivadas, podendo promover o crescimento do hospedeiro e funcionar como antagonistas de pragas (Revisados por Jaber e Owley, 2018; Revisados por Mantzoukas e Eliopoulos, 2020).

1.2.4 O gênero *Metarhizium* spp.

De maneira geral, os fungos entomopatogênicos (incluindo o *Metarhizium* sp.) são organismos eucariótico, com paredes celulares compostas por quitinas e/ou celulose e glucanas. Suas formas de obtenção de nutrientes são variáveis, indo desde a saprotrofia (decomposição da matéria orgânica) até a associação positiva (protocooperação e simbiose) ou negativa (parasitismo) com outros organismos vivos (Samson et al., 2013). Seu crescimento ocorre na forma filamentosa, ou seja, por meio de hifas, que quando agrupadas, recebem o nome de micélio (Fontes et al., 2020). O gênero *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) abrange diversas espécies de entomopatogênicos, distribuídas uniformemente ao redor do mundo, e pode ser o mais abundante em solos agrícolas (Milner, 1992; Bidochka et al., 1998). Exemplos destas espécies são *M. brunneum*, *M. robertsii*, *M. flavoviridae* e, a mais importante do ponto de vista agrícola, o *M. anisopliae* (Bischoff et al. 2009). Algumas dessas espécies possuem patogenicidade de espectro estreito, ou seja, são mais especializadas em determinadas ordens, entretanto, o *M. anisopliae* é generalista, conhecido por infectar mais de sete ordens de artrópodes (Aw e Hue 2017).

Conídios de *M. anisopliae* vem sendo massivamente utilizados para elaboração de produtos comerciais, devido a sua efetividade no controle de pragas agrícolas de importância econômica, como os cercopídeos (Hemiptera: Cercopidae) *Deois flavopicta*, *Mahanarva fimbriolata*, *Notozulia entreriana*, *Zulia entreriana* e dos percevejos *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) e *Scaptocoris castanea* (Hemiptera: Cydnidae) (BRASIL, 2021b). O ciclo parasitário destes fungos se inicia com a adesão de conídios no exoesqueleto do inseto. Após a germinação e formação do apressório, a cutícula é transgredida por meio de uma combinação de força mecânica e degradação de alguns componentes pela ação de enzimas, como proteases, quitinases e lipases (Schrank e Vainstein 2010; Pedrini et al. 2013). Com a penetração bem-sucedida, as hifas entram em contato com a hemolinfa e se diferenciam em estruturas denominadas blastosporos, bastante semelhantes a leveduras, que se espalham pela hemocele e iniciam a produção de micotoxinas (Ríos-Moreno et al., 2016). Estas micotoxinas, que no caso do *Metarhizium* sp. é principalmente destruxina, levam o inseto à morte num período de 3 a 9 dias após o início da infecção (Barelli et al., 2015). Durante esse período, as hifas colonizam o interior do corpo do hospedeiro e absorvem nutrientes, que darão subsídio para a esporulação do fungo. Essa fase tem início com a extrusão de hifas para exterior do corpo, que se diferenciam e começam a conidiogênese, ou seja, dão início a produção das estruturas de disseminação, denominadas de

conídios. Estas estruturas microscópicas esverdeadas, com formato ovalado, são propagadas pela ação do vento, chuva, manejos agrícolas e artrópodes (Samson et al., 2013).

Ao entrarem em contato com o tegumento de insetos hospedeiros, dão início a uma nova infecção, reiniciando o ciclo. Mas, além do modo de vida entomopatogênico, espécies do gênero *Metarhizium* sp. também podem sobreviver na ausência de insetos, colonizando a rizosfera, exercendo atividade saprofítica nos perfis superiores do solo ou sobrevivendo de forma endofítica em plantas.

1.2.5 Fungos entomopatogênicos endofíticos

O aproveitamento da capacidade de isolados de fungos entomopatogênicos colonizarem endofiticamente diversas plantas de interesse agrícola é algo recente e vem se mostrando uma alternativa promissora no antagonismo a agentes bióticos causadores de danos (Sasan e Bidochka, 2013; Jaber e Enkerli, 2017). O termo endofítico (Bary, 1986) é utilizado para definir microrganismos (bactérias ou fungos) que sobrevivem dentro dos tecidos vivos de plantas autótrofas, não ocasionando qualquer efeito negativo aparente ou prejuízos à saúde do hospedeiro. Esta relação ecológica desenvolvida por plantas e outros seres vivos é complexa, podendo promover uma supressão de pragas e doenças (Barelli et al., 2016), além de estimular o crescimento vegetal (Lopez e Sword, 2015).

Isolados de fungos entomopatogênicos com esse comportamento já foram reportados em vários estudos científicos, sendo as principais espécies *B. bassiana* e *M. anisopliae*, verificados em culturas de interesse econômico como algodão (Griffin, 2007), banana (Akello et al., 2008), tomate (Garcia et al., 2011), pinus (Brownbridge et al., 2012), morango (Canassa et al., 2019), milho (Ramos et al., 2020). No entanto, não foram localizados estudos envolvendo a ação endofítica desses fungos em gramíneas forrageiras.

1.2.6 Fungos endofíticos promotores de crescimento vegetal

A relação endofítica entre plantas e fungos entomopatogênicos é capaz de promover o desenvolvimento vegetal (Garcia et al., 2011; Sasan e Bidocka, 2012; Lopez e Sword, 2015). Esse efeito estimulante é resultado de mecanismos e ações promovidos pelos fungos que podem beneficiar a planta por proporcionar seu crescimento de forma direta ou indireta (Sudha et al., 2016). A forma direta ocorre devido ao estímulo do fungo à produção de fitohormônios, como as

auxinas e citocininas (Luz, 2006). Além disso, podem otimizar a absorção de nutrientes por meio das raízes, em função da colonização dos fungos na rizosfera e formação de micorrizas arbusculares, que aumentam a área de solo explorada (Bruck, 2009; Liao et al., 2014). Estudos realizados na última década demonstraram uma transferência do nitrogênio obtido de insetos colonizados pelos fungos para plantas, por meio da interação entre micélios e raízes, expondo um ramo adicional do ciclo de nitrogênio no solo (Behie et al., 2017; Sasan e Bidochka., 2013; Vinha, 2018). A promoção do crescimento de forma indireta está relacionada a fatores bióticos, como uma maior ação defensiva a insetos e patógenos, que quando suprimidos, possibilitam um maior e mais saudável desenvolvimento da planta hospedeira (Castillo-Lopez et al., 2014; Jaber e Ownley, 2017).

Diversos autores já verificaram a aplicabilidade de fungos entomopatogênicos endofíticos para a melhoria de aspectos agrônômicos em culturas agrícolas. Elena et al. (2011) verificaram um incremento significativo na altura, comprimento e peso seco de raízes de tomateiros inoculados com alguns dos isolados de *M. anisopliae* testados, destacando a diferença da ação promotora de crescimento que existe entre isolados de uma mesma espécie de fungo. Plantas de batatas inoculadas via aplicação de encapsulados de *M. brunneum* (Hypocreales: Clavicipitaceae) tiveram maior produtividade, incremento da área foliar e da qualidade nutricional, além de serem mais eficientes no uso da água do que plantas não inoculadas (Krell et al., 2018). Ahmad e colaboradores (2020) inocularam sementes de milho com conídios de *M. robertsii* (Hypocreales: Clavicipitaceae), e verificaram que plantas inoculadas possuíam maior tamanho e biomassa acima do solo do que plantas controle.

Os parâmetros para definir se ocorreram alterações no desenvolvimento vegetal se baseiam em características vegetativas como taxa germinativa de sementes (Jaber e Enkerli, 2016), desenvolvimento de raízes e partes aéreas (Lopez e Sword, 2015), quantidade de folhas e flores etc. A modificação desses fatores é dependente da compatibilidade entre a espécie hospedeira e a cepa fúngica utilizada, assim como as condições ambientais do meio no qual estão inseridos (Biswas et al., 2013), motivo pelo qual podem existir variações na intensidade e qualidade das modificações.

1.2.7 Fungos entomopatogênicos endofíticos e sua efetividade no manejo de pragas e doenças

A proteção vegetal conferida por fungos entomopatogênicos endofíticos pode exercer significativa redução em danos ocasionados por pragas (Muvea et al., 2014; Canassa et al., 2019) e patógenos (Jaber, 2018; Jaber e Alanambeh, 2018). Diferentes mecanismos ecológicos estão envolvidos nas respostas aos distintos organismos, variando de acordo com o hospedeiro, espécie e isolado do fungo. O antagonismo sobre microrganismos fitopatogênicos pode ocorrer por micoparasitismo, alelopatia, competição por nicho, entre outros. Contudo, os mecanismos atrelados aos efeitos prejudiciais dos fungos entomopatogênicos endofíticos aos insetos ainda não estão bem compreendidos (Vidal e Jaber, 2015). Isto se deve ao fato de que um número reduzido de autores conseguiu reisolar estruturas fúngicas de cadáveres recuperados de tecidos vegetais colonizados (Vidal e Jaber, 2015; Garrido-Jurado et al., 2016). O controle é atribuído, na maioria dos casos, a antibiose devido a metabolitos fúngicos ou resistência sistêmica induzida pelas plantas, mesmo que poucos trabalhos tenham investigado esses efeitos de forma profunda (Lopes e Sword, 2015; Jaber e Ownley, 2017).

O biocontrole direto de insetos com micopesticidas por meio de pulverizações foliares ou de aplicações no solo é recorrente em áreas agrícolas, desempenhando um papel importante no manejo de pragas. Esse método de controle é intensificado com a colonização endofítica por fungos entomopatogênicos, que possuem potencial de proporcionar redução da herbívora e aumento da produtividade. Já foram relatadas colonização desses organismos em diversas culturas, sendo eficaz contra espécies de distintas ordens taxonômicas como Lepidoptera (Cherry et al., 2004; Powell et al., 2007), Coleoptera (Akello et al., 2008; Biswas et al., 2013), Hemiptera (Castillo-Lopez et al., 2014; Garrido-Jurado et al., 2016), Diptera (Akutse et al., 2013), Thysanoptera (Muvea et al., 2014), entre outras (Jaber e Ownley, 2017).

Garrido-Jurado et al (2020), demonstraram a colonização endofítica de *Metarhizium brunneum* em plantas de melão, e os efeitos diretos depreciativos desta associação na sobrevivência, fertilidade e consumo alimentar de larvas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com discos foliares de plantas colonizadas. Os resultados encontrados revelam o alto potencial de fungos entomopatogênicos endofíticos para manejar populações de insetos mastigadores. Outros estudos, como o de Ramos et al. (2020), avaliaram o efeito de plantas de milho colonizadas com *B.bassiana* e *M. anisopliae* na alimentação de lagartas de 2º instar de *Spodoptera frugiperda*, verificando mortalidades de até 100%. Canassa et al. (2019) verificaram

redução significativa nas populações de *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari: Tetranychidae) e um melhor desenvolvimento de plantas de feijoeiro inoculadas com *M. robertsii* e *B.bassiana*.

Fungos entomopatogênicos endofíticos reduzem danos ocasionados por pragas em culturas agrícolas de importância econômica significativa, como *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiros (Mahmoud et al., 2021); insetos sugadores em videiras (Rondot, e Reineke, 2018); *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) em algodão (Castillo-Lopez et al., 2014) e *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) em citrus (Bamisile et al., 2019). Estes resultados evidenciam o potencial que inseticidas microbianos possuem em programas de controle biológico, antagonizando artrópodes pragas e promovendo o crescimento de plantas. Dessa forma, combinar a ação direta das pulverizações foliares com os efeitos promovidos pela colonização endofítica de fungos entomopatogênicos pode proporcionar incrementos importantes para a eficácia de micopesticidas, culminando num melhor controle de pragas agrícolas. Além de auxiliar na superação de limitações inerentes a aplicação tópica de conídios, como resistência as condições ambientais adversas e potenciais efeitos em organismos não alvo (Lacey et al., 2015; Vinha, 2018).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Verificar o potencial de colonização endofítica e micorrízica de isolados catarinenses de *Metarhizium* spp. (Ascomycota: Hypocreales) e avaliar suas aptidões como promotores de crescimento e indutores de resistência sobre gramíneas forrageiras.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o desenvolvimento e parâmetros nutricionais de *Urochloa brizantha* inoculadas com 14 isolados de *Metarhizium* sp.
- Caracterização de diferentes métodos de inoculação (tratamento de sementes, imersão de raízes, soil drench) para o estabelecimento endofítico de *M. anisopliae* em *Urochloa brizantha*, *Axonopus catharinensis*, e *Cynodon dactylon*.

- Quantificar a persistência de 14 isolados de *Metarhizium* sp. no substrato de plantas inculadas com conídios.
- Avaliação do efeito sobre a biologia de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de *Cynodon dactylon* colonizadas endofiticamente com 3 isolados de *M. anisopliae*.

1.4 REFERÊNCIAS

Aguiar, D.A., Mello, M.P., Nogueira, S.F., Gonçalves, F.G., Adami, M., Rudorff, B.F.T., 2017. MODIS time series to detect anthropogenic interventions and degradation processes in tropical pasture. *Remote Sensing*, 9(1), 73.

Ahmad, I., Jiménez-Gasco, M.D.M., Luthé, D.S., Barbercheck, M.E., 2020. Systemic colonization by *Metarhizium robertsii* enhances cover crop growth. *J. Fungus*. 6(2): 64.

Akutse, K.S., Maniania, N.K., Fiaboe, K.K.M., Berg, J.D., Ekesi, S., 2013. Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on the life-history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Fungal Ecol.* 6(4). 293-301.

Akello, J., Dubois, T., Coyne, D., Kyamanywa, S., 2008. Endophytic *Beauveria bassiana* in banana (*Musa* spp.) reduces banana weevil (*Cosmopolites sordidus*) fitness and damage. *Crop Protection*, v.27, n.11, p.1437-1441.

Auad, A.M.; Silva, S.E. U., 2019. Pasture. In: *Natural Enemies of Insect Pests in Neotropical Agroecosystems*, Springer. 369-382.

Aw K.M.S, Hue S.M., 2017. Mode of Infection of *Metarhizium* spp. fungus and their potential as biological control agents. *J Fungi* 3(2):30

Schrank A, Vainstein M.H., 2010. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56:1267–1274

Bamisile, B.S.; Dash, C.K.; Akutse, K.S.; Qasim, M.; Ramos Aguila, L.C.; Wang, F.; Kepannan, R.; Wang, L, 2019. Endophytic *Beauveria bassiana* in Foliar-Treated Citrus limon Plants Acting as a Growth Suppressor to Three Successive Generations of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). *Insects*, 10, 176.

Feltran-Barbieri, R., Féres, J.G. 2021. Degraded pastures in Brazil: improving livestock production and forest restoration. *Royal Society Open Science*, 8(7), 201854.

Barelli, L., Moonjely, S., Behie, S.W., 2016. Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. *Plant Mol. Biol.* 90(6), 657-664.

Bary, A, 1866. Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten du Myxomyceten. Engelmann, Leipzig,.

Behie, S.W., Moreira C.C., Sementchoukova I., Barelli L., Zelisko P.M., Bidochka M.J., 2017. Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. *Nat Commun* 8: 142-145.

Belay, Y.C., Tenkegna, T.A., 2017. Bioassay and pilot mass production of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* for the control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*: Scolytidae), Ferrari. *J. Appl. Biosci*, 117, 11669-11683.

Bidochka, M.J., Kasperski, J.E., Wild, G.A.M., 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Can. J. Bot.* 76, 1198–1204.

Bischoff, J.F., Rehner, S.A., Humber, R.A., 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512–530.

Biswas, C.; Dey, P.; Satpathy, S.; Satya, P.; Mahapatra, U.S. Endophytic colonization of white jute (*Corchorus capsularis*) plants by different *Beauveria bassiana* strains for managing stem weevil (*Apion corchori*). *Phytoparasitica*, v.41, p.17-21, 2013.

BRASIL - Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Brasília, 2021b.

Bruck, D.J., 2009. Fungal entomopathogens in the rhizosphere. The ecology of fungal entomopathogens. Springer. 77, 103-112.

Brownbridge, M.; Reay, S.D.; Nelson, T.L.; Glare, T.R. Persistence of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte following inoculation of radiata pine seed and seedlings. *Biological Control*, v.6, n.1(3), p.194-200, 2012.

Canassa, F., D’Alessandro, C.P., Sousa, S.B., Demétrio, C.G.B., Meyling, N.V., Klingen, I., Delalibera, I., 2019. Fungal isolate and crop cultivar influence the beneficial effects of root inoculation with entomopathogenic fungi in strawberry. *Pest. Manag. Sci.* 76(4), 1472-1482.

Carvalho, T.B. de; Zen, S. de; Tavares, E.C.N. (2009). Comparação de custo de produção na atividade de pecuária de engorda nos principais países produtores de carne bovina. In: Congresso da sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. 47., Porto Alegre.

Castillo-Lopez D., Zhu-Salzman K., Ek-Ramos M.J., Sword G.A., 2014. The entomopathogenic fungal endophytes *Purpureocillium lilacinum* (formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Beauveria bassiana* negatively affect cotton aphid reproduction under both greenhouse and field conditions. *PLoS ONE*, 9 (116): 53- 61.

Cherry, A.J.; Banito, A; Djegui, D.; Lomer, C. Suppression of the stem-borer *Sesamia calamistis* (Lepidoptera; Noctuidae) in maize following seed dressing, topical application and stem injection

with African isolates of *Beauveria bassiana*. International Journal of Pest Management, v. 50, n. 1, p. 67-73, 2004.

Costa, D.F.A., Correia, P.S., Dorea, J.R.R., De Souza, J., Congio, G.F., Pires, A.V., Santos, F.A.P., 2020. Strategic supplementation of growing cattle on tropical pastures improves nutrient use and animal performance, with fewer days required on the finishing phase. Animal Production Science, 61(5), 480-493.

Dias-Filho, M.B., 2014. Diagnóstico das pastagens no Brasil. Embrapa Amazônia. Oriental-Documentos (INFOTECA-E). Censo agropecuário, IBGE. 2017. Disponível em https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3093/agro_2017_resultados_preliminar.es.pdf. Acesso em: 01/06/2021

Donga, T.K.; Vega, F.E.; Klingen, I. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as an endophyte in sugarcane, *Saccharum officinarum*. Fungal Ecology, v. 35, p. 70-77, 2018.

Elena, G.J., Beatriz, P.J., Alejandro, P., Lecuona, R., 2011. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. Adv Biol Res. 5, 22–27.

Ferguson, C.M.; Sue, P. Pasture Pests - Are they the real problem?. Proceedings of the 22nd International Grassland Congress. New Zealand, p. 1623-1624, 2013.

Fontes, E.M.G., Valadares-Inglis, M.C., Fontes, E.M.G., Valadares M.C., 2020. Controle biológico de pragas da agricultura. Embrapa.

EMBRAPA, 2018. Quantificação das áreas destinadas à proteção e preservação da vegetação nativa e demais usos e ocupação das terras no Brasil (2018). Disponível em: [https://www.embrapa.br/en/car/sintese#:~:text=O%20mundo%20rural%20brasileiro%20utiliza,nacional%20\(25%2C6%25\)](https://www.embrapa.br/en/car/sintese#:~:text=O%20mundo%20rural%20brasileiro%20utiliza,nacional%20(25%2C6%25).). Acesso em: 01/08/2022

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). Journal of Pest Science, v. 90, n. 1, p. 319-330, 2016.

Garrido-Jurado, I., Montes-Moreno, D., Sanz-Barrionuevo, P., Quesada-Moraga, E., 2020. Delving into the Causes and Effects of Entomopathogenic Endophytic *Metarhizium brunneum* Foliar Application-Related Mortality in *Spodoptera littoralis* larvae. Insects. 11(7), 429.

Garcia, J.E.; Posadas, J.B.; Peticari, A.; Lecuona, R.E. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. Advanced Biological Research, v.5, p.22–27, 2011.

Galdino, S., Sano, E.E., Andrade, R.G., Grego, C.R., Nogueira, S.F., Bragantini, C., Flosi, A.H., 2016. Large-scale modeling of soil erosion with Rusle for conservationist planning of degraded cultivated Brazilian pastures. *Land degradation & development*, 27(3), 773-784.

Griffin M.R., 2007. *Beauveria bassiana*, a cotton endophyte with biocontrol activity against seedling disease. Ph.D. Dissertation, The University of Tennessee, Knoxville, TN, USA.

Gusmão, M.R., Valério, J.R., Matta, F.P., Souza, F.H.D., Vigna, B.B.Z., Fávero, A.P., Inácio, G. R., 2016. Warm-season (C4) turfgrass genotypes resistant to spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae). *Journal of economic entomology*, 109(4), 1914-1921.

Hohlenwerger, C.C.; Metzger, J.P.W., 2016. A estrutura da paisagem e o potencial controle das "cigarrinhas-das-pastagens". Universidade de São Paulo, São Paulo.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística., 2018. Pesquisa pecuária municipal. Available from: <http://www.ibge.gov.br/>. Accessed March 2021.

Jaber, L.R., Ownley, B.H., 2018. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Bio. Control*. 116, 36-45.

Jaber, L.R., Enkerli, J., 2017. Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth? *Biocontrol Sci. Technol.* 27(1), 28-41.

Jaber, L.R., Alananbeh, K.M., 2018. Fungal entomopathogens as endophytes reduce several species of *Fusarium* causing crown and root rot in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biological Control*, 126, 117–126. doi:10.1016/j.biocontrol.2018.08.007

Jaber, L.R., 2018. Seed inoculation with endophytic fungal entomopathogens promotes plant growth and reduces crown and root rot (CRR) caused by *Fusarium culmorum* in wheat. *Planta*. doi:10.1007/s00425-018-2991-x

Jank, L., Barrios, S.C., do Valle, C.B., Simeão, R.M., Alves, G.F., 2014. The value of improved pastures to Brazilian beef production. *Crop and Pasture Science*, 65(11), 1132-1137.

Karuppaiah, V., 2017. Variation in insecticide detoxification enzymes activity in *Spodoptera litura* (Fabricius) of different geographic origin. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, v. 5, n. 3, p. 770-773.

Krell, V., Unger, S., Jakobs-Schoenwandt, D., Patel, A.V., 2018. Endophytic *Metarhizium brunneum* mitigates nutrient deficits in potato and improves plant productivity and vitality. *Fungal Ecology*, 34, 43–49. doi:10.1016/j.funeco.2018.04.002

LAPIG. Atlas digital das pastagens brasileira, (2017). Disponível em <https://www.lapig.iesa.ufg.br/lapig/index.php/produtos/atlas-digital-das-pastagens-brasileiras> . Acesso em: 15/06/2021.

Lacey, L.A.; Grzywacz, D.; Shapiro-ilan, D.I.; Frutos, R.; Brownbridge, M.; Goettel, M.S., 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *J. Invertebr. Pathol*, Amsterdam, 132, pp. 1-41.

Lacey, L.A.; Kaya, H.K. Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests. Dordrecht: Springer. 2nd ed. 2007.

Liao, X., 2014. The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*, 98(16), 7089-7096.

Lira, A. C.; Mascarin, G. M.; Delalibera Jr.; Í. 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.

Lovatto, M., Ribeiro, L.P., 2017. Manejo das cigarrinhas-das-pastagens com fungos entomopatogênicos. *Agro. Catarinense*, 30 (2), 42-46.

Lopez, D.C., Sword, G.A., 2015. 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*). *Bio. Control*. 89, 53-60.

Luz, J. S.; Oliveira S. R. L.; Silveira, E.B.; Cavalcante, U.M.T. 2006. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. *Revista Caatinga*, v.19, n.2, p.128-134.

Mascarin, G.M.; Pauli, G., 2015. Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos. Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica. Viçosa: *UR EPAMIG ZM*, v.4, p.169-195.

Macedo, M.C.M; Barbosa, R.A., 2006. Aspectos edáficos relacionados com a produção de *Urochloa* (*syn. Urochloa*) *brizantha* cultivar Marandu. Morte de pastos de braquiárias. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. p.35-65.

Mantzoukas, S., Eliopoulos, P.A., 2020. Endophytic entomopathogenic fungi: A valuable biological control tool against plant pests. *Applied Sciences*, 10(1), 360.

Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., & Hakeem, K. R., 2016. Effects of pesticides on environment. In *Plant, soil and microbes* (pp. 253-269). Springer, Cham.

Magnanini, A., 1961. Aspectos fitogeográficos do Brasil, Áreas e Características no Passado e no Presente. *Revista Brasileira de Geografia*, 4, 93-102.

Mahmood, I., Imadi, S.R., Shazadi, K., Gul, A., Hakeem, K.R., 2016. Effects of pesticides on environment. In *Plant, soil and microbes* (pp. 253-269). Springer, Cham.

Milner, R.J., 1992. Selection and characterization of strains of *Metarhizium anisopliae* for control of soil insects in Australia. In: Lomer, C.J., Prior, C. (Eds.), *Biological Control of Locusts and Grasshoppers*. CAB International, Wallingford, pp. 200– 207.

Mora, M.A.E.; Castilho, A.M.C.; Fraga, M.E., 2016. Fungos entomopatogênicos: Enzimas, toxinas e fatores que afetam a diversidade. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v. 18, n.3, p.335-349.

Mohamed Mahmoud, F., Bendebbah, R., Benssaci, B., Toudji, F., Tafifet, L., & Krimi, Z., 2021. Entomopathogenic efficacy of the endophytic fungi: *Clonostachys* sp. and *Beauveria bassiana* on *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) larvae under laboratory and greenhouse conditions. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 31(1). doi:10.1186/s41938-021-00392-8

Muller, M.M., Guimaraes, M.F., Desjardins, T., Mitja, D., 2004. The relationship between pasture degradation and soil properties in the Brazilian Amazon: a case study. Agriculture, ecosystems & environment, 103(2), 279-288.

Mudronceková, S.; Mazán, M.; Nemcovic, M.; Salamon, I., 2019. Entomopathogenic fungus species *Beauveria bassiana* (Bals.) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) used as mycoinsecticide effective in biological control of *Ips typographus* (L.). Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, p. 2469-2472.

Muvea, A. M.; Meyhöfer, R.; Subramanian, S.; Poehling, H. M.; Ekesi, S.; Maniania, N. K., 2014. Colonization of onions by endophytic fungi and their impacts on the biology of *Thrips tabaci*. Plos one, 9-9 -108.

Nava-Pérez, E.; García-Gutiérrez, C.; Camacho-Báez, J.R.; Vázquez-Montoya, E.L., 2012. Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. Ra Ximhai, v.8(3) 17-29.

Pereira, O. J. R., Ferreira, L. G., Pinto, F., & Baumgarten, L., 2018. Assessing pasture degradation in the Brazilian Cerrado based on the analysis of MODIS NDVI time-series. Remote Sensing, 10(11), 1761.

Pedrini N, Ortiz-Urquiza A, Huarte-Bonnet C., 2013. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. Front Microbiol 4:1–18.

Pitta, R.M.; Matiero, S.C.; Corassa, J.D.N.; Rampelotti-Ferreira, F.T., 2019. Influence of pastoral systems on *Mahanarva spectabilis* (Distant) (Hemiptera: Cercopidae) and the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Embrapa Agrossilvipastoril.

Powell, W.A.; Klingeman, W.E.; Ownley, B.H.; Gwinn, K.D.; Dee, M.; Flanagan, P.C., 2007. Endophytic *Beauveria bassiana* in tomatoes yields mycosis in tomato fruitworm larvae. HortScience. 42(4), 933-934.

Ramos, Y., Taibo, A.D., Jiménez, J.A., Portal, O., 2020. Endophytic establishment of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in maize plants and its effect against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. Egypt. J. Biol. Pest Control. 30(1), 1-6.

Rembischevski, P.; Caldas, E.D., 2018. Agroquímicos para controle de pragas no Brasil: análise crítica do uso do termo agrotóxico como ferramenta de comunicação de risco. Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia. 6(4) 2-12.

Ríos-Moreno, A., Garrido-Jurado, I., Resquín-Romero, G., Arroyo-Manzanares, N., Arce, L., & Quesada-Moraga, E., 2016. Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during

transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*. *Biocontrol science and technology*, 26(11), 1574-1585.

Rondot, Y., Reineke, A., 2018. Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. *Biological Control*, v. 116, p. 82-89.

Rocha, G.L., 1988. A evolução da pesquisa em forragicultura e pastagens no Brasil. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, 45, 5-51.

Samson, R. A., Evans, H.C., Latgé, J.P., 2013. *Atlas of entomopathogenic fungi*. Springer Science & Business Media.

Sasan, R.K.; Bidochka, M.J., 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *Wiley, American Journal Of Botany*, 99(1) 101-107.

Sasan, R.K.; Bidochka, M.J., 2013. Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani*. sp. phaseoli. Informa UK Limited. *Canadian Journal Of Plant Pathology*, 35(3) 288-293.

Sartor, L.R., Gouvea, A., 2009. Manejo integrado de pragas de pastagens. *Sistemas de Produção Agropecuária*.

Sánchez-Rodríguez, A.R.; Raya-Díaz, S.; Zamarréño, Á.M.; García-Mina, J.M.; Del Campillo, M.C.; Quesada-Moraga, E., 2017. An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae. *Biological Control*, (16)90-102.

Schöbel, C., & Carvalho, G. S., 2020. Niche modeling of economically important *Mahanarva* (Hemiptera, Cercopidae) species in South and Central America: are brazilian spittlebug sugarcane pests potential invaders of south and Central America?. *Journal of economic entomology*, 113(1), 115-125.

Sudha, V.; Govindaraj, R.; Baskar, K.; Al-Dhabi, N. A.; Duraipandiyan, V., 2016. Biological properties of endophytic fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 59.

USDA (2022) Livestock and poultry: world markets and trade. Available from <https://www.fas.usda.gov/data/livestock-and-poultry-world-markets-and-trade> Accessed 15 April 2022

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

Vidal, S., Jaber, L.R., 2015. Entomopathogenic fungi as endophytes: plant–endophyte–herbivore interactions and prospects for use in biological control. *Current Science.*, Bengaluru, (109) 46-54.

Vinha F.B., 2018. Potential of inoculation of entomopathogenic fungi in soybean planting for pest management. *Dissertação, Universidade de São Paulo*.

Weiler, R.L.; Teixeira, F.S.; Kaneko, L.; Weiler, C.A. 2017. Occurrence of entomopathogenic fungi *Lecanicillium longisporum* Zimmerman on *Orthezia praelonga* Douglas (Hemiptera: Ortheziidae). *Citrus Research & Technology*, 32(1) 53-58.

Zimmermann G., 2007. Review on Safety of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci Technol*, 17(5): 553-596.

CAPÍTULO 2

Fungos entomopatogênicos endofíticos como promotores de crescimento de *Urochloa brizantha*: potencial como inoculante de sementes

2.1 RESUMO

Interações endofíticas com fungos entomopatogênicos podem afetar positivamente o crescimento e desenvolvimento de plantas cultivadas. No entanto, não há estudos que avaliem a influência de isolados de *Metarhizium* spp. sobre o crescimento de plantas de *Urochloa brizantha* (Stapf) R. Webster (Poaceae), mesmo sendo a aplicação de micoinseticidas bastante comum em áreas de pastagens visando o manejo do complexo de cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação promotora de crescimento de 14 isolados nativos de *Metarhizium* spp., obtidos de áreas de pastagens, e 2 isolados comerciais amplamente utilizados em formulações de micoinseticidas no Brasil, sobre *U. brizantha* cv. MG5, via tratamento de sementes. Considerando as variáveis do crescimento (parte aérea e radicular) de plantas inoculadas, os isolados CEPAF_ENT 25, CEPAF_ENT 26, CEPAF_ENT 27, CEPAF_ENT 42, CEPAF_ENT 59 e o isolado comercial IBCB425 destacaram-se como os tratamentos mais promissores. Com exceção do isolado CEPAF_ENT 59, houve uma correlação positiva entre parâmetros do crescimento de *U. brizantha* com os teores de pigmentos fotossintéticos analisados e com os teores de N, P e Zn. Testes de colonização endofítica indicaram a presença de *Metarhizium* spp. em raízes, folhas e com maior frequência em colmos. todos os isolados foram recuperados do substrato de cultivo das plantas de *U. brizantha*, demonstrando a sua persistência ao longo do período avaliado. O tratamento de sementes de *U. brizantha* com conídios dos isolados selecionados proporcionou aumentos significativos na germinação e crescimento inicial de plântulas de *U. brizantha*. Assim, tais isolados podem ser utilizados na formulação de inoculantes biológicos comerciais para o tratamento de sementes de *U. brizantha*.

Palavras-chave: Interações planta-fungo, *Metarhizium* spp., plantas forrageiras, pigmentos fotossintéticos, nutrição da planta.

2.2 ABSTRACT

Endophytic interactions of entomopathogenic fungi can positively affect the growth and development of cultivated plants. However, no studies have been carried out, so far, that seek to evaluate the influence of *Metarhizium* spp. on the growth of *Urochloa brizantha* (Stapf) R. Webster (Poaceae) plants, even though the application of mycoinsecticides is quite common in pasture areas aiming at the management of the pasture leafhopper complex. Thus, the objective of this study was to evaluate the growth promoting action of 14 native isolates of *Metarhizium* spp., obtained from pasture areas, and 2 commercial isolates widely used in mycoinsecticide formulations in Brazil, on *U. brizantha* cv. MG5, via seed treatment. Considering all growth variables (shoots and roots) of inoculated plants, the isolates CEPAF_ENT 25, CEPAF_ENT 26, CEPAF_ENT 27, CEPAF_ENT 42, CEPAF_ENT 59 and the commercial isolate IBCB 425 stood out as the most promising treatments. With the exception of the CEPAF_ENT 59 isolate, Biplot analysis indicated a positive correlation between the growth parameters of *U. brizantha* with the analyzed photosynthetic pigment levels and with the levels of N, P and Zn. Furthermore, endophytic colonization tests indicated the presence of *Metarhizium* spp. in all parts of the evaluated plants (root, stem and leaf), more frequently in stems. In addition, all isolates were recovered from the substrate of *U. brizantha* plants, demonstrating their persistence throughout the evaluated period. In addition, treatment of *U. brizantha* seeds with conidia of selected isolates provided significant increases in germination and initial growth of *U. brizantha* seedlings. Thus, such isolates can be used in the formulation of commercial biological inoculants for the treatment of *U. brizantha* seeds.

Keywords: Plant-fungus interactions, *Metarhizium* spp., forage plants, photosynthetic pigments, plant nutrition.

2.3 INTRODUÇÃO

Em virtude dos menores custos, sistemas de produção de carne/leite à base de pastagens são os mais utilizados na bovinocultura brasileira, que possui o maior rebanho comercial do planeta (Dias-Filho, 2014; Flores et al. 2018; USDA, 2019). Cerca de 47 milhões de hectares são ocupadas com pastagens naturais e aproximadamente 200 milhões de hectares com pastagens cultivadas (anuais ou perenes), das quais mais da metade são constituídas por *Urochloa* spp. (syn. *Brachiaria*), que perfaz a monocultura mais extensa do mundo e a gramínea mais representativa dos trópicos (Jank et al. 2014; IBGE, 2017; Congio et al. 2020).

O principal problema fitossanitário observado nesses agroecossistemas é a ocorrência de pragas, especialmente cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae), um complexo de insetos que reduzem significativamente a produtividade e a qualidade das forragens produzidas em áreas altamente infestadas (Congio et al., 2020; Schoebel e Carvalho, 2020). Os danos ocasionados pelo complexo de cigarrinhas-das-pastagens impactam diretamente a produtividade dos rebanhos, visto que as forrageiras são à base da alimentação dos animais, aspecto que limita a rentabilidade dos sistemas pastoris e acelera os processos de degradação dos pastos (Congio et al., 2020).

A aplicação de inseticidas sintéticos é o principal método empregado no manejo do complexo de cigarrinhas-das-pastagens no Brasil e em outros países sul-americanos (Bernardo et al., 2018). Entretanto, tal método possui custos restritivos e riscos toxicológicos e ambientais, além da necessidade de um intervalo de segurança após a aplicação (Lovatto e Ribeiro, 2017). Assim, alternativas mais sustentáveis têm sido estudadas e implementadas, sendo a aplicação de micoinseticidas à base do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) uma das mais utilizadas em virtude da ampla disponibilidade de formulações comerciais (Samson e Evans, 2013; Mantzoukas e Eliopoulos, 2020). Além do promissor efeito biopesticida, o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* também ocorre naturalmente nos solos de agroecossistemas pastoris e de modo endofítico em plantas cultivadas e silvestres, influenciando positivamente em sua ecologia, aptidão e evolução (Kago et al., 2016). Com a aplicação massiva (controle biológico inundativo) de conídios de *Metarhizium* para controle de pragas, estes efeitos positivos podem ser, em hipótese, intensificados, tendo em vista a associação protooperativa que se forma quando o fungo se estabelece na rizosfera e de forma endofítica nas plantas inoculadas (Lopez e Sword, 2015; Barelli et al., 2016). No entanto, o sucesso dessas interações é dependente da espécie de fungo em questão e de suas variações intraespecíficas (isolados), assim como das especificidades das espécies vegetais em questão.

Interações endofíticas de isolados de *Metarhizium* podem promover o crescimento e desenvolvimento de plantas inoculadas e antagonizar a ação de pragas e fitopatógenos (Montzoukas e Eliopoulos, 2020). Apesar do crescente número de estudos que demonstram os potenciais da aplicação de *Metarhizium* spp. como endofítico e/ou promotor de crescimento, ainda são necessários estudos complementares para otimização dessa tecnologia e aplicação no campo, incluindo a seleção de isolados mais efetivos. Não obstante, não foram realizados estudos, até o momento, que buscassem avaliar a influência de isolados de fungos entomopatogênicos sobre o desenvolvimento de plantas de *Urochloa* spp., mesmo sendo a aplicação de *Metarhizium* spp. comum em áreas de pastagens visando o controle do complexo de cigarrinhas. Esse conhecimento pode promover um manejo sustentável dos sistemas de produção, reduzindo a aplicação de inseticidas sintéticos, aumentando a resiliência dos sistemas pastoris e contribuindo para o equilíbrio biológico desses agroecossistemas.

Diante desse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação promotora de crescimento de 14 isolados nativos de *Metarhizium* spp. obtidos de áreas de pastagens de Santa Catarina, Brasil e dois isolados comerciais amplamente utilizados em formulações de micoinseticidas, sobre *Urochloa brizantha* (Stapf) R. Webster (Poaceae), via tratamento de sementes. Além disso, também foi avaliada a relação entre a composição química e os níveis de pigmentos fotossintéticos com parâmetros do crescimento de plantas inoculadas. Por fim, foi realizada a confirmação do processo de colonização endofítica em diferentes partes da planta e a persistência e produção de conídios em substrato, assim como o efeito do tratamento das sementes com os diferentes isolados na germinação e estabelecimento inicial de *U. brizantha*.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Isolados de *Metarhizium* spp.

Os isolados de *Metarhizium* spp. foram obtidos de amostras de solo coletadas em áreas de pastagens de diferentes regiões de Santa Catarina (Tabela 1; Figura 1), Brasil (sem histórico de uso de micoinseticidas) e pré-selecionados em estudo prévio com base na análise integrada das variáveis virulência (ação biopesticida contra Cigarrinhas-das-pastagens) e produção de conídios (potencial biotecnológico) (Ribeiro et al., *in prep.*). Os isolados encontram-se depositados na Coleção de Fungos Entomopatogênicos da Epagri/Cepaf, em Chapecó, SC, Brasil, sendo mantidos em tubos criogênicos com glicerol 10% e em ultrafreezer (-80 °C) (Behle et al., 2014). Para fins de

comparação, também foram estudados os isolados comerciais IBCB425 e E9 de *M. anisopliae*, com ampla utilização no manejo do complexo de cigarrinhas-das-pastagens no Brasil (Lovatto e Ribeiro, 2017).

A identificação e análise da diversidade filogenética dos isolados de *Metarhizium* spp. foi realizada por análise molecular (Ribeiro et al., *in prep.*). Para isso, foi realizada a extração de DNA de cada isolado, amplificação de parte do gene codificador da beta-tubulina e da região ITS (Internal Transcribed Spacer) por PCR e posterior sequenciamento. O locus nuclear 5'-TEF foi amplificado e sequenciado para todos os isolados com os primers EF1T (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e EF2T (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT) de acordo com Bischoff et al. (2009). A amplificação por PCR e sequenciamento dos locos intergênicos nucleares MzIGS3 e MzFG543igs seguiu o método descrito por Kepler e Rehner (2013), usando os primeiros pares MzIGS3_1F (5'-CGTGGCTCCTGACCATGGTTGC) x MzIGS3_4R (5'-GCGGGGGAGCCGACTTGGA) e MzFG543igs_2F (5'-TCTCTACAACCGTACCCGACA) x MzFG543igs_6R (5'-GATAGCTCGCCTTCTGCCTTG), respectivamente.

Tabela 1. Relação de isolados de *Metarhizium* spp. estudados.

Nº do Isolado	Origem	Espécie
EPAGRI_ENT 25	Canoinhas*	<i>Metarhizium anisopliae</i>
EPAGRI_ENT 26	Alto da Bela Vista*	<i>Metarhizium brunneum</i>
EPAGRI_ENT 27	Campo Erê*	<i>Metarhizium anisopliae</i>
EPAGRI_ENT 28	Campo Erê*	<i>Metarhizium robertsii</i>
EPAGRI_ENT 29	Bom Retiro*	<i>Metarhizium anisopliae</i>
EPAGRI_ENT 30	Bom Retiro*	<i>Metarhizium</i> sp.
EPAGRI_ENT 34	Alto da Bela Vista*	<i>Metarhizium brunneum</i>
EPAGRI_ENT 39	Arvoredo*	<i>Metarhizium anisopliae</i>
EPAGRI_ENT 42	Bom Retiro*	<i>Metarhizium anisopliae</i>
EPAGRI_ENT 46	Canoinhas*	<i>Metarhizium anisopliae</i>
EPAGRI_ENT 50	Bom Retiro*	<i>Metarhizium</i> sp.
EPAGRI_ENT 58	Brunópolis*	<i>Metarhizium anisopliae</i>
EPAGRI_ENT 59	Brunópolis*	<i>Metarhizium anisopliae</i>
EPAGRI_ENT 60	Brunópolis*	<i>Metarhizium</i> sp.
E9	Isolado comercial (ESALQ/USP)	<i>Metarhizium anisopliae</i>
IBCB 425	Isolado comercial (Instituto Biológico de São Paulo)	<i>Metarhizium anisopliae</i>

*Isolados depositados na Coleção de Fungos Entomopatogênicos da EPAGRI/CEPAF, oriundos de áreas de pastagens de diferentes municípios de Santa Catarina, Brasil.

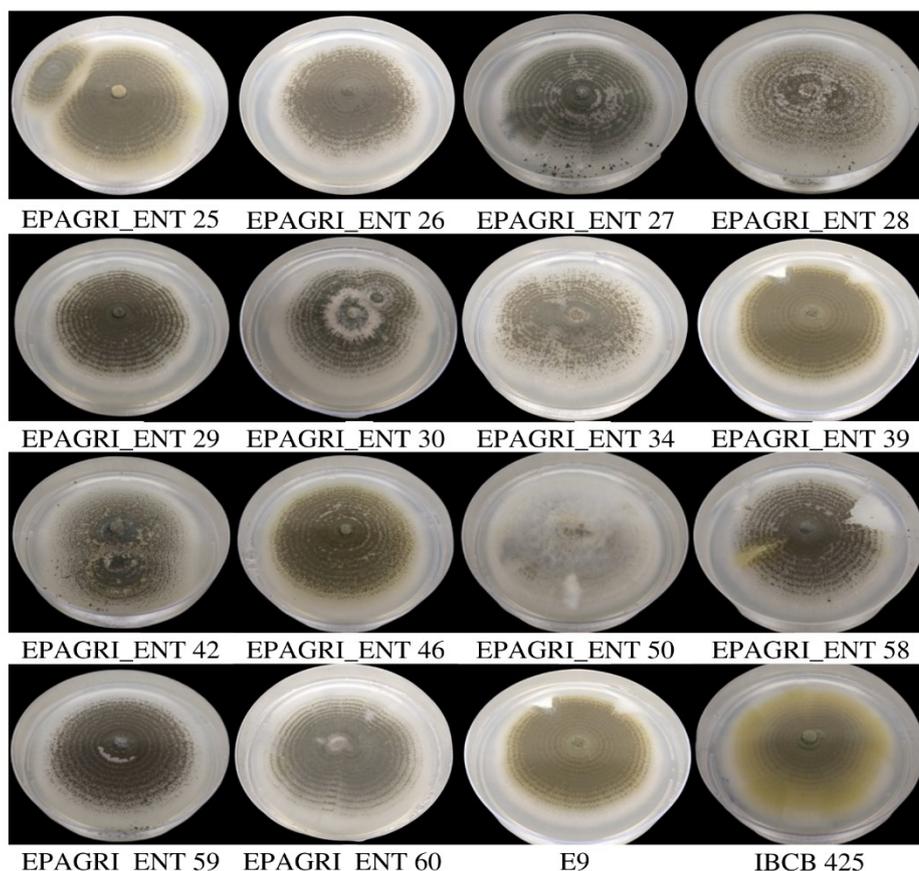


Figura 1. Aspectos morfológicos das colônias dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. estudados.

2.4.2 Planta forrageira: obtenção e multiplicação

Sementes nuas (não tratadas) de *U. brizantha* cv. MG5 (Bonamigo Sementes Ltda., Campo Grande, MS, Brasil) foram utilizadas. Antes da semeadura, a dormência das sementes foi quebrada por meio do armazenamento em estufa com circulação de ar, regulada a 36 °C, durante 5 dias (RAS, 2009). Para o estabelecimento das plantas, utilizou-se substrato comercial Turfa Fértil® (Florestal S.A., Balneário Arroio do Silva, SC, Brasil), autoclavado três vezes a 120 °C por 1 h. As plantas desenvolveram-se em fitotron sob condições controladas (26 °C, U.R.: 70 ± 10% e fotofase: 12 h) e irrigação manual, realizada sempre que necessário de modo a manter a capacidade de campo.

2.4.3 Obtenção dos conídios e preparo das suspensões

Conídios dos 16 isolados de *Metarhizium* spp. foram multiplicados em placas de Petri contendo 15 mL de meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) Difco® (Becton-Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, USA) e mantidas a 26 °C e fotofase de 14 h. Após 10 dias de incubação, os conídios produzidos foram retirados pela

raspagem da superfície das placas com uma espátula esterilizada e subsequente imersão em becker com água destilada contendo Tween 80[®] 0,01% (v v⁻¹) em câmara de fluxo laminar. Visando remover fragmentos de hifas e meio de cultura, a suspensão foi posta 2 vezes em uma centrífuga por 3 min, a 3.000 rpm. As soluções obtidas foram agitadas com o auxílio de um vórtex e as concentrações estimadas por meio de um hemocitômetro. Para todos os ensaios envolvendo inoculação das plantas, foi utilizada a concentração de 1×10^8 conídios mL⁻¹.

A viabilidade dos conídios foi verificada através de teste de germinação em meio BDA Difco[®] (Oliveira et al., 2015). Para isso, 100 µL da suspensão ajustada a 1×10^6 conídios mL⁻¹ foram uniformemente espalhadas na superfície de placas de Petri contendo 8 mL de meio de cultura, dispostas dentro de uma câmara de fluxo de laminar. Após a evaporação do excedente de umidade, as placas foram fechadas e mantidas sob condições controladas durante 20 h (temperatura de 26 °C, fotofase de 14 h), para germinação dos conídios. Foram utilizados nos bioensaios os isolados que alcançaram uma taxa de germinação superior a 90%.

2.4.4 Inoculação dos isolados fúngicos em sementes de *Urochloa brizantha*

As sementes de *U. brizantha* cv. MG5 foram previamente desinfestadas pela imersão em álcool 70% (v v⁻¹) por 1 min, seguido de solução de hipoclorito de sódio 2% (v v⁻¹) por 3 min e tríplice lavagem com água destilada (Parsa et al., 2013). A inoculação dos isolados de *Metarhizium* spp. foi realizada pela deposição de 2 mL da suspensão de conídios na concentração de 1×10^8 conídios mL⁻¹, diretamente sobre as 5 sementes contidas em cada vaso (unidades experimentais), utilizando-se uma pipeta com ponteira estéril para cada isolado. No tratamento controle, foi aplicado somente água destilada + Tween 80[®] 0,01% (v v⁻¹). Após as inoculações, os vasos foram mantidos em fitotron (26 ± 2 °C, U.R.: 70 ± 10% e fotofase: 12 h) (Figura 2), sendo irrigados diariamente com água destilada esterilizada sempre que necessário. Foram utilizados 7 vasos (repetições) para cada tratamento, totalizando 119 vasos dispostos sob delineamento inteiramente aleatorizado.



Figura 2. Vasos contendo sementes de *U. brizantha* inoculadas com os isolados de *M. anisopliae* dentro do Fitotron

2.4.5 Efeito dos isolados de *Metarhizium* spp. em parâmetros do crescimento de *Urochloa brizantha*

O efeito do tratamento de sementes com os distintos isolados de *Metarhizium* spp. sobre parâmetros do crescimento de *U. brizantha* foi avaliado após 45 dias da inoculação (*endpoint* do bioensaio). Para isso, foi quantificada a altura da maior folha, o número de folhas planta⁻¹, o comprimento da maior raiz e a massa fresca e seca da parte aérea e das raízes. A altura foi medida desde o colo da planta até a ponta da folha verdadeira mais longa, assim como as raízes, que foram medidas da base da planta até a extremidade da maior raiz. As análises de massa fresca da parte aérea e raízes foram realizadas logo após as medições, no *endpoint* do bioensaio. Para as pesagens, utilizou-se balança analítica de precisão Unibloc AUY220 (Shimadzu Corp., Manila, Filipinas), sendo as amostras posteriormente dispostas em sacos de papel pardo e secas em estufa a 65±5 °C até atingirem massa constante (~ 7 dias). Decorrido esse período, a massa seca também foi pesada em balança analítica de precisão.

2.4.6 Quantificação do teor de pigmentos fotossintéticos das plantas inoculadas

A produção de pigmentos fotossintéticos (clorofila a e b, carotenoides) das plantas inoculadas com os diferentes tratamentos foi avaliada após 45 dias (*endpoint* do bioensaio). Para isso, folhas centrais de cada uma das plantas foram coletadas, congeladas em ultrafreezer (- 80°C) e, posteriormente, moídas em nitrogênio líquido. Feito isso, amostras de 10 mg de cada amostra

foram transferidas para um frasco contendo 5 mL de solução aquosa de acetona 80% (v v⁻¹) por 24 h. Decorrido esse período, a solução foi filtrada e a absorbância medida em espectrofotômetro Specord® 200 Plus (Analytic Jena AG, Jena, Alemanha) a 470, 646.8 e 663.6 nm. As concentrações de carotenoides e de clorofila a e b foram calculadas a partir da absorbância do extrato usando a fórmula adaptada por Lichtenthaler (1987):

$$\text{Chlorophyll a} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = (12.25 \times A_{663.6} - 2.69 \times A_{646.8}) \times \frac{50}{1000}$$

$$\text{Clorophyll b} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = (21,50) \times A_{646.8} - 5,1 \times A_{663.6}) \times \frac{50}{1000}$$

$$\text{Carotenoid} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = ((1000 \times A_{470}) - (1.82 \times \text{Chl a}) - (85,02 \times \text{Chl b})/198) \times \frac{50}{1000}$$

2.4.7 Quantificação do teor de macro e micronutrientes das plantas inoculadas

Após a secagem e obtenção do teor de massa seca da parte aérea de *U. brizantha* submetidas aos diferentes tratamentos, as repetições de cada tratamento foram agrupadas (devido a pequena massa disponível) e moídas em moinho do tipo Willey (Marconi Equipamentos para Laboratórios Ltda., Piracicaba, SP, Brasil). Os teores de macronutrientes (N, P, K, Ca e Mg) foram determinados após digestão sulfúrica, enquanto os teores de micronutrientes (Zn, Fe, Cu, Mn e S) foram quantificados após digestão nitroperclórica (Silva, 2009). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível (Bel Engineering Corp., Monza, Itália), a 420 nm (Bataglia et al., 1983). Os teores de fósforo (P) foram quantificados em espectrofotômetro UV-visível a 882 nm (Murphy e Riley, 1962). O N total foi determinado em destilador micro-Kjeldahl TE-0363 (Tecnal Equipamentos Científicos Ltda., Piracicaba, SP, Brasil), (Tedesco et al., 1995). As leituras de K, Ca, Mg, S, Zn, Fe, Cu e Mn foram realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica Analyst 2000 (PerkinElmer do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

2.4.8 Confirmação do processo de colonização endofítica

A confirmação da colonização endofítica foi realizada para os 6 isolados mais promissores e para o isolado comercial E9, selecionados de acordo com as análises dos parâmetros de crescimento de *U. brizantha*. A confirmação da colonização do fungo nos tecidos vegetais seguiu

o método proposto por Parsa (2013), com modificações, e foi realizado após 10, 20 e 40 dias da germinação das sementes inoculadas com os conídios dos distintos isolados, seguindo o mesmo procedimento anteriormente descrito.

Decorridos os referidos períodos, 4 vasos de plantas inoculadas com cada isolado foram escolhidos aleatoriamente. Em laboratório, as plantas foram desenvasadas e lavadas com água destilada. Posteriormente, foram retirados 2 pedaços de aproximadamente 10 cm de folhas, caules e raízes. As partes vegetais foram separadamente lavadas com água destilada estéril, levadas para câmara de fluxo e desinfetadas pela imersão em álcool 70% (v v⁻¹) por 2 min. Posteriormente, os fragmentos foram imersos em hipoclorito de sódio a 2,5% (v v⁻¹) por 2 min, finalizando com 3 imersões de 1 min em água destilada estéril. Em seguida, as amostras de cada parte vegetal foram acondicionadas em placas de Petri esterilizadas, onde as bordas externas dos fragmentos foram excisadas e descartadas, visando eliminar a parte interna do tecido que entrou em contato com as substâncias desinfetantes. Os pedaços vegetais remanescentes foram cortados em 10 partes (1,5 cm fragmento⁻¹), com auxílio de um bisturi esterilizado, e transferidos para placas de Petri contendo 8 mL de meio BDA seletivo [0,5 g L⁻¹ de ciclohexamida, 0,2 g L⁻¹ de cloranfenicol, 0,002% de acetato de N- dodecil guanidínio (Dodex[®] 450 SC) e 0,01 g L⁻¹ de cristal violeta] proposto por Behie et al. (2015). As placas contendo os fragmentos de folhas, caules e raízes (separadamente) foram seladas com plástico filme e mantidas em câmara climatizada (26 °C, fotofase = 14 h) durante 15 dias (Figura 4). Para cada tratamento, utilizou-se 4 repetições dispostas sob delineamento inteiramente aleatorizado.

A confirmação da colonização endofítica pelo fungo inoculado foi feita pela observação de estruturas fúngicas (conidióforos e conídios) características de *Metarhizium* sp. em microscópio óptico com aumento de 400 × Axio Scope A1 (Carl Zeiss do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), com posterior identificação morfológica seguindo Driver et al. (2000) e Brunner-Mendoza et al. (2018).

Para verificar se o processo de limpeza das amostras foi eficiente, após a desinfecção superficial e eliminação das bordas, foi feita uma impressão do tecido vegetal esterilizado em meio BDA, como proposto por Schultz et al. (1998). Posteriormente, caso fosse detectado o crescimento de microrganismos indesejados nessas placas, a amostra correspondente era substituída.

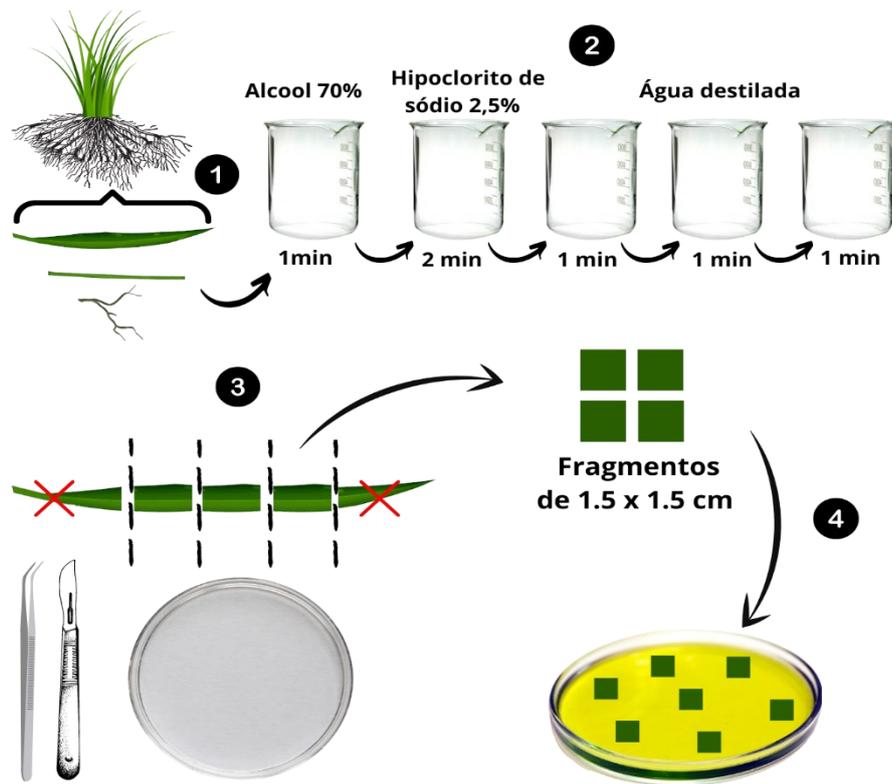


Figura 3. Método utilizado para avaliação da colonização endofítica de isolados de *Metarhizium* spp. em plantas de *Urochloa brizantha* cv. MG5.

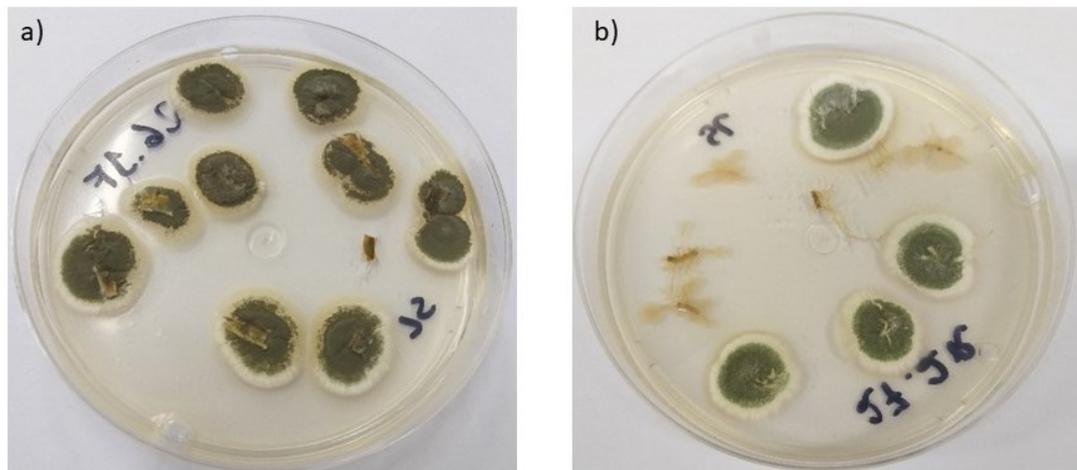


Figura 4. Confirmação da presença do *M. anisopliae* em tecidos vegetais (a: Folhas; b: Raízes) de plantas de *U. brizantha* inoculadas.

2.4.9 Persistência e produção de conídios dos isolados fúngicos no substrato

Amostras do substrato onde foram cultivadas as 4 plantas de cada tratamento, utilizadas para os testes de colonização endofítica, foram coletadas separadamente e armazenadas em frascos

ependorf esterelizados, nos 3 intervalos após a inoculação dos isolados fúngicos (10, 20 e 40 dias) (Figura 5). Nestes períodos, a concentração de conídios foram determinadas pela diluição de 1 g de solo em 10 mL de água destilada esterelizada contendo Tween[®] 80 a 0,01% (v v⁻¹). Essa solução de água e solo foi homogeneizada em um vortex e diluída seriadamente (10⁻¹, 10⁻²), para que 0,5 mL da solução 10² fosse plaqueada em placas de Petri contendo 8 mL de BDA seletivo [0,5 g L⁻¹ de ciclohexamida, 0,2 g L⁻¹ de cloranfenicol, 0,002% de acetato de N- dodecil guanidínio (Dodex[®] 450 SC) e 0,01 g L⁻¹ de cristal violeta]. Todas as placas foram seladas com plástico filme e mantidas sob condições controladas (26 °C, fotofase de 14 h), durante 15 dias, visando avaliar a germinação dos conídios e crescimento de colônias no meio de cultura (Figura 6). Decorrido esse período, o número de unidades formadoras de colônias (UFCs) foram contadas em cada placa e a confirmação da espécie presente foi feita mediante observação das estruturas reprodutivas (conidióforos e conídios) em microscópio óptico com aumento de 400 × (Driver et al., 2000; Brunner-Mendoza et al., 2018, Garrido-Jurado et al., 2020).

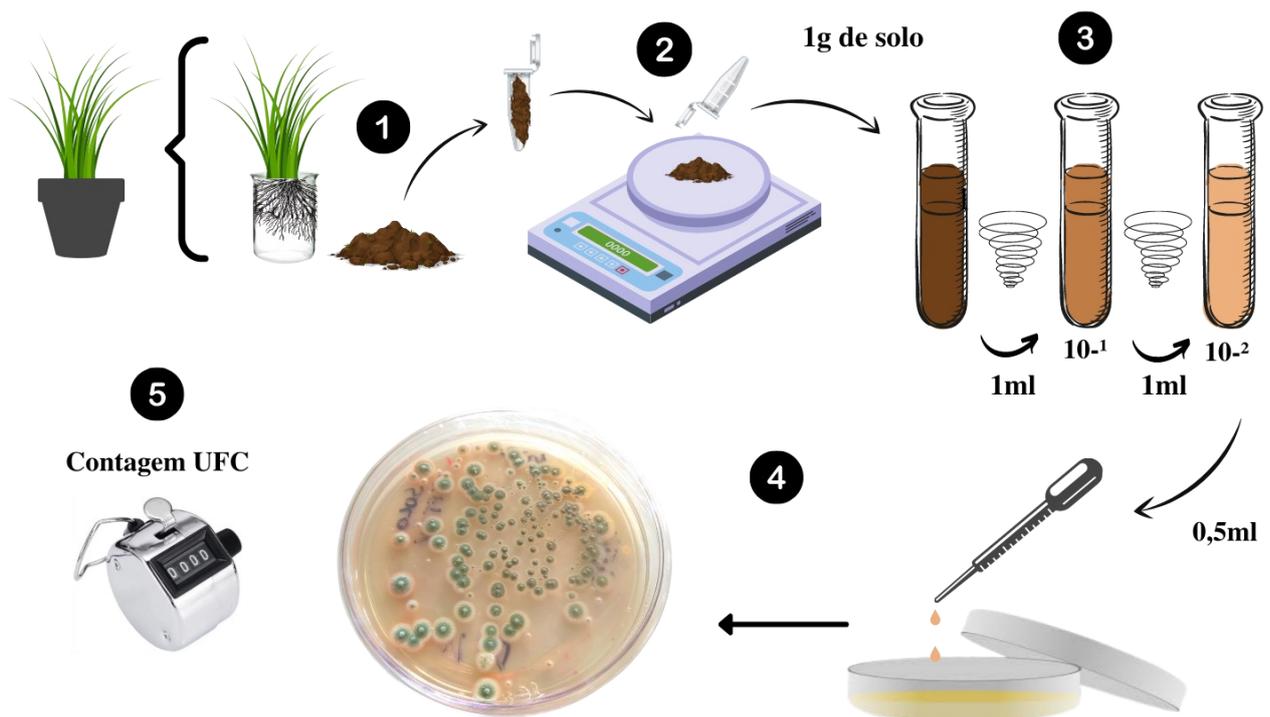


Figura 5. Esquema ilustrativo do método utilizado na contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) a partir do substrato.

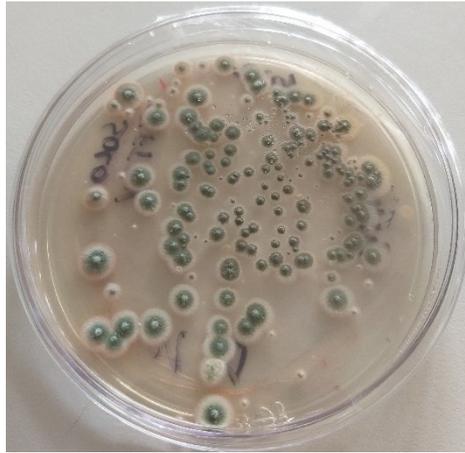


Figura 6. Germinação de conídios de *M. anisopliae* obtidos do substrato de plantas inoculadas.

2.4.10 Efeito de isolados de *Metarhizium* spp. na germinação de sementes de *Urochloa brizantha*

O efeito dos isolados mais promissores (6) na germinação de sementes de *U. brizantha* cv. MG5 foi avaliada após a quebra da dormência, conforme procedimento (RAS, 2009) descrito previamente. Feito isso, as sementes foram desinfestadas pela imersão em álcool 70% (v v⁻¹) por 1 min, seguido de solução de hipoclorito de sódio 2% (v v⁻¹) por 3 min e tríplice lavagem com água destilada. Posteriormente, as sementes foram embebidas em suspensão (água destilada esterilizada com 0,01% de Tween[®] 80) de conídios (1×10^8 conídios mL⁻¹), durante 18 h a 25° C (Figura 7). No controle, foi utilizado somente água esterilizada com 0,01% de Tween[®] 80 para imersão das sementes, sob as mesmas condições. Após 18 h, as sementes de cada tratamento foram separadas em 3 grupos (repetições) de 100 sementes e postas de forma equidistante em papéis filtro umedecidos e esterilizados (250 °C por 1 h), sendo, posteriormente, mantidos em condições controladas (26 °C, U.R.: $90 \pm 10\%$ e fotofase: 12 h). Decorridos 7, 14 e 21 dias após a semeadura, foram avaliadas a taxa de germinação, comprimento das raízes e tamanho das partes aéreas das plântulas formadas.

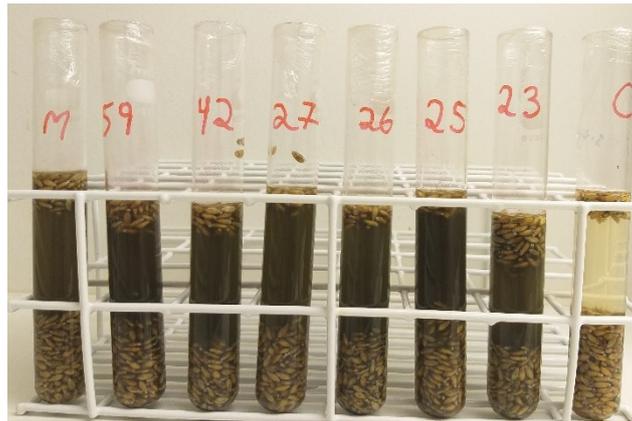


Figura 7. Imersão de sementes de *U. brizantha* em suspensão de conídios de *M. anisopliae*.

2.4.11 Análise dos dados

Primeiramente, foi realizado um pré-ajuste do modelo normal aos dados e foi verificada a normalidade de resíduos com o teste de Shapiro-Wilk (Shapiro and Wilk, 1965), bem como a homogeneidade de variâncias com o teste de Bartlett (Bartlett, 1937). Quando os dados não apresentaram normalidade e/ou homocedasticidade, foi utilizada uma transformação com base no método da potência ótima de Box-Cox (Box and Cox, 1964). Satisfeitas as condições, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando houve diferença significativa entre os tratamentos, múltiplas comparações (teste de Scott-knott $p < 0,05$) foram realizadas para os tratamentos com níveis qualitativos. Nos casos em que a transformação dos dados não satisfizes às condições para a análise de variância, foi buscado o ajuste por meio de um modelo linear generalizado (GLM) pertencente à família exponencial de distribuições (Nelder and Wedderburn, 1972). Os dados foram submetidos à análise de agrupamento após o cálculo da distância euclidiana e o método da média como critério de agrupamento. Aplicou-se a análise de componentes principais e a apresentação em um gráfico Biplot. No Biplot, as setas representam as variáveis medidas e os pontos representam as espécies avaliadas. As análises de agrupamento e componentes principais foram realizadas com as variáveis padronizadas. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software estatístico “R”, versão 2.15.1 (R Development Core Team, 2022).

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Efeito de isolados de *Metarhizium* spp. em parâmetros do crescimento de *Urochloa brizantha*

Houve diferença significativa entre os isolados testados em relação aos parâmetros de crescimento de plantas (parte aérea e radicular) de *U. brizantha* cv. MG5 após 45 dias do tratamento de suas sementes com os distintos isolados de *Metarhizium* spp. (Tabela 2). Plantas tratadas com os isolados CEPAF_ENT25, CEPAF_ENT26, CEPAF_ENT27, CEPAF_ENT42 e IBCB425 apresentaram maiores alturas e maiores dimensões da maior folha. Por outro lado, os isolados CEPAF_ENT28, CEPAF_ENT29, CEPAF_ENT39 e E9 reduziram o tamanho médio das plantas e, com exceção do isolado E9, a dimensão da maior folha em relação ao controle negativo (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros de crescimento de plantas de *Urochloa brizantha* cv. MG5 após 45 dias do tratamento de suas sementes com diferentes isolados de *Metarhizium* spp.

1

Isolados	Altura plantas (cm) ¹	Comprimento maior folha (cm) ¹	Massa folhas (g) ¹		Comprimento maior raiz (cm) ¹	Massa raiz (g) ¹	
			Fresca	Seca		Fresca	Seca
CEPAF_ENT 25	52,87 ± 2,16 a	38,60 ± 1,95 a	4,83 ± 0,25 a	0,96 ± 0,06 a	24,68 ± 1,43 a	4,88 ± 0,41 a	0,64 ± 0,04 a
CEPAF_ENT 26	51,79 ± 2,88 a	35,07 ± 2,43 a	5,15 ± 0,24 a	1,04 ± 0,6 a	24,75 ± 2,10 a	5,10 ± 0,32 a	0,62 ± 0,02 a
CEPAF_ENT 27	49,28 ± 1,18 a	34,92 ± 0,87 a	4,45 ± 0,16 b	0,92 ± 0,04 a	20,45 ± 0,50 b	4,92 ± 0,46 a	0,54 ± 0,02 a
CEPAF_ENT 28	32,19 ± 2,12 c	22,39 ± 1,60 c	1,31 ± 0,15 d	0,28 ± 0,04 d	21,73 ± 1,96 a	1,22 ± 0,25 c	0,20 ± 0,02 c
CEPAF_ENT 29	34,51 ± 1,62 c	23,89 ± 1,27 c	1,33 ± 0,12 d	0,27 ± 0,02 d	18,71 ± 0,76 b	1,79 ± 0,28 c	0,21 ± 0,03 c
CEPAF_ENT 30	42,66 ± 2,12 b	28,78 ± 2,15 b	2,81 ± 0,42 c	0,61 ± 0,10 c	21,15 ± 1,08 b	3,39 ± 0,41 b	0,39 ± 0,06 b
CEPAF_ENT 34	41,85 ± 1,60 b	30,25 ± 1,27 b	2,54 ± 0,37 c	0,52 ± 0,08 c	26,12 ± 1,08 b	3,04 ± 0,27 b	0,35 ± 0,03 b
CEPAF_ENT 39	35,40 ± 2,18 c	26,17 ± 1,91 c	1,17 ± 0,13 d	0,23 ± 0,02 d	23,72 ± 1,02 a	1,30 ± 0,11 c	0,16 ± 0,01 c
CEPAF_ENT 42	54,83 ± 3,26 a	40,92 ± 2,50 a	3,73 ± 0,30 b	0,76 ± 0,05 b	21,90 ± 1,07 a	2,92 ± 0,20 b	0,37 ± 0,03 b
CEPAF_ENT 46	43,68 ± 2,12 b	30,64 ± 1,77 b	3,90 ± 0,40 b	0,84 ± 0,08 b	20,81 ± 1,12 b	2,92 ± 0,35 b	0,45 ± 0,04 b
CEPAF_ENT 50	45,12 ± 3,18 b	34,52 ± 2,74 a	1,93 ± 0,14 d	0,39 ± 0,03 d	22,54 ± 1,47 a	1,44 ± 0,24 c	0,25 ± 0,02 c
CEPAF_ENT 58	38,37 ± 1,69 c	25,38 ± 1,54 c	1,62 ± 0,19 d	0,34 ± 0,03 d	22,32 ± 0,86 a	0,91 ± 0,20 c	0,19 ± 0,02 c
CEPAF_ENT 59	53,15 ± 1,14 a	38,71 ± 1,02 a	4,80 ± 0,23 a	0,97 ± 0,05 a	23,35 ± 1,03 a	5,00 ± 0,31 a	0,56 ± 0,03 a
CEPAF_ENT 60	40,88 ± 1,53 b	30,24 ± 1,15 b	1,79 ± 0,20 d	0,37 ± 0,04 d	18,22 ± 0,57 b	1,49 ± 0,36 c	0,20 ± 0,03 c
E9	38,74 ± 4,05 c	28,36 ± 3,12 b	1,40 ± 0,19 d	0,29 ± 0,05 d	22,39 ± 1,28 a	1,12 ± 0,21 c	0,22 ± 0,02 c
IBC425	52,37 ± 2,18 a	37,37 ± 2,05 a	4,33 ± 0,88 b	0,82 ± 0,16 b	23,90 ± 0,94 a	2,84 ± 0,59 b	0,42 ± 0,06 b
Controle	44,49 ± 1,53 b	32,30 ± 1,12 b	4,05 ± 0,28 b	0,78 ± 0,06 b	21,15 ± 0,68 b	2,96 ± 0,27 b	0,40 ± 0,03 b
F	9,824	7,9055	20,025	18,595	3,0877	20,615	23,361
gl	16, 102	16, 102	16, 102	16, 102	16, 102	16, 102	16, 102
Valor de p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0005	<0,0001	<0,0001

4 Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott (p < 0,05).

Plantas de *U. brizantha* inoculadas com os isolados CEPAF_ENT25, CEPAF_ENT26 e CEPAF_ENT59 apresentaram maiores teores de massa fresca de folhas (Tabela 2). Além disso, plantas inoculadas com tais isolados (juntamente com o isolado CEPAF_ENT27) apresentaram maiores teores de massa seca de folhas, massa fresca e seca de raízes. Por sua vez, plantas inoculadas com os isolados CEPAF_ENT25, CEPAF_ENT26, CEPAF_ENT28, CEPAF_ENT39, CEPAF_ENT42, CEPAF_ENT50, CEPAF_ENT58, CEPAF_ENT59, E9 e IBCB425 apresentaram maiores tamanhos da maior raiz (Tabela 2). De modo geral, entre os 16 isolados testados, 7 deles condicionaram respostas positivas no crescimento de plantas de *U. brizantha*, com destaque para o isolado CEPAF_ENT 25 que propiciou peso seco médio total (parte aérea + radicular) de 40,6% superior a plantas não tratadas (controle) (Figura 8).



Figura 8. Raízes de *Urochloa brizantha* inoculadas com o isolado CEPAF_ENT 25 de *Metarhizium anisopliae* (5 amostras à esquerda) e não inoculadas (5 amostras à direita).

Análise de agrupamento hierárquico considerando todas as variáveis analisadas na triagem inicial indicou a formação de 3 grupos (Figura 9), considerando como ponto de corte a metade da distância Euclidiana estimada. O primeiro grupo compreendeu os isolados CEPAF_ENT25, CEPAF_ENT26, CEPAF_ENT27, CEPAF_ENT42, CEPAF_ENT59 e IBCB425, que apresentaram os efeitos promotores de crescimento mais pronunciados. O segundo grupo

compreendeu os isolados que não apresentaram efeitos promissores e o controle negativo. O terceiro grupo englobou os isolados que, de modo geral, afetaram negativamente os parâmetros de desenvolvimento de *U. brizantha* (Figura 9). Assim, com base em tais resultados, selecionou-se os isolados englobados no grupo 1 para os testes subsequentes. Para fins de comparação, também foi incluído o isolado comercial E9 em virtude de sua ampla utilização em áreas de pastagens no Brasil.

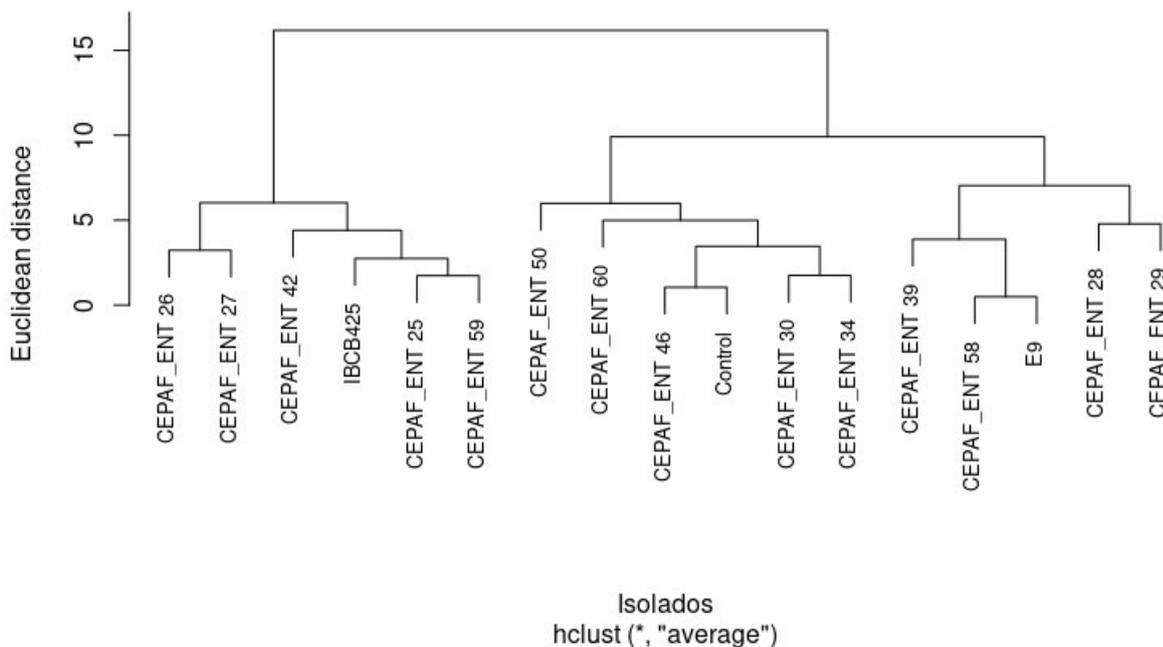


Figura 9. Análise de agrupamento com base na similaridade da ação promotora de crescimento de isolados de *Metarhizium* spp. sobre plantas de *Urochloa brizantha* cv. MG5 (Distância Euclidiana média como medida de dissimilaridade e método da média como estratégia de agrupamento).

2.5.2 Similaridade na composição química e nos teores de pigmentos fotossintéticos e relação com parâmetros do crescimentos de plantas inoculadas de *Urochloa brizantha*

A análise de agrupamento realizada com base na similaridade nos teores de macro e micronutrientes e de pigmentos fotossintéticos (clorofila a e b e carotenoides) de plantas de *U. brizantha* cv. MG5 inoculadas com diferentes isolados de *Metarhizium* spp. mostrou grandes variações entre os tratamentos (Figura 10). Considerando a metade da distância Euclidiana (= 3) como ponto de corte, os isolados mais promissores (CEPAF_ENT25, CEPAF_ENT26, CEPAF_ENT27, CEPAF_ENT42 e IBCB425), juntamente com plantas do controle, formaram dois grupos intermediários com maior similaridade. Análise de componentes principais mostrou uma correlação positiva entre tais tratamentos com os teores de pigmentos fotossintéticos (clorofila

a e b e carotenoides) e de N, P e Zn, mas inversamente correlacionados com os teores de Fe (Figura 10B). Por sua vez, o isolado CEPAF_ENT59 apresentou uma composição bastante distinta dos demais tratamentos promissores (Figura 10). Em material suplementar (SM-Tabela 1) encontram-se os teores de pigmentos fotossintéticos e de macro e micronutrientes de plantas oriundas dos distintos tratamentos.

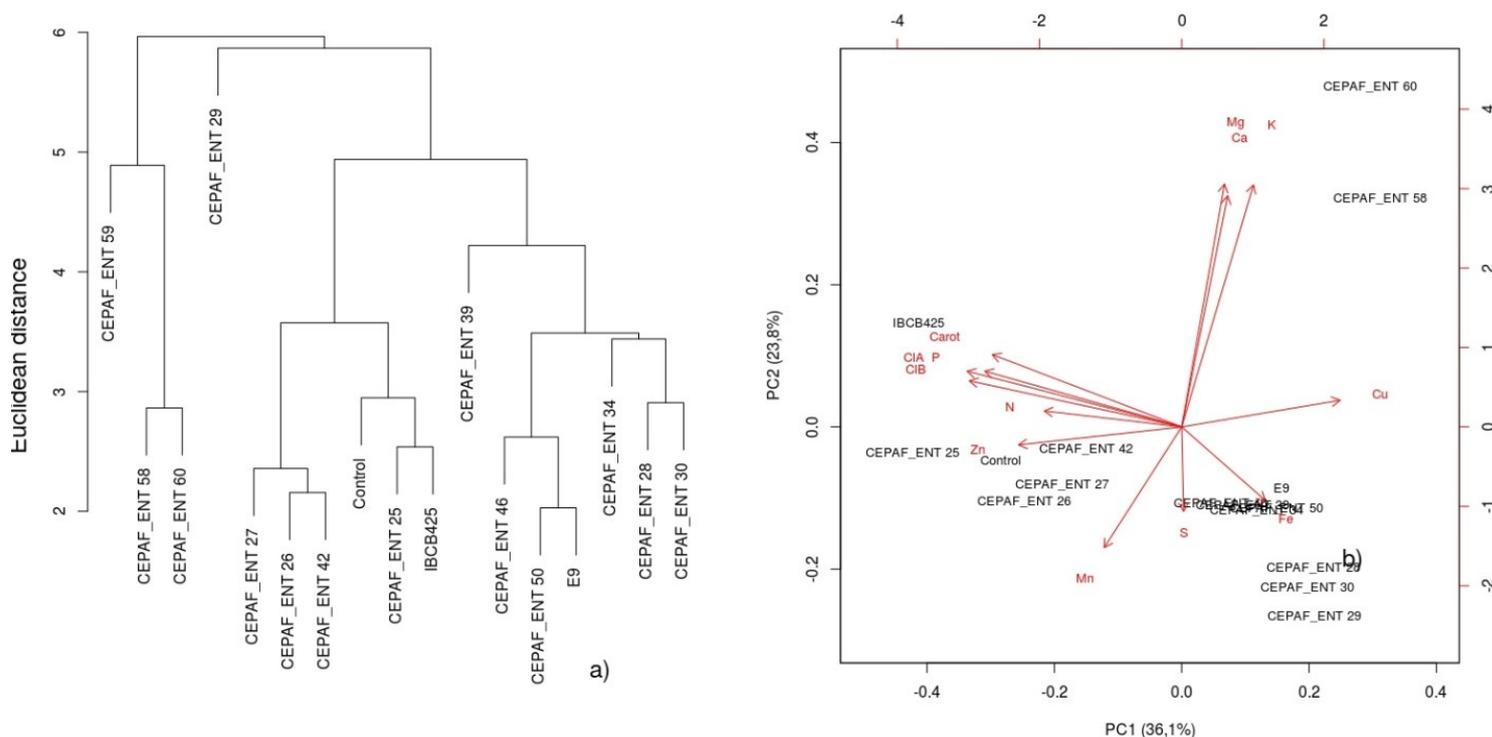


Figura 10. a) Dendrograma obtido a partir de análise de agrupamento com base na similaridade no teor de macro e micronutrientes e de pigmentos fotossintéticos (clorofila a e b e carotenoides) de plantas de *Urochloa brizantha* cv. MG5 inoculadas com diferentes isolados de *Metarhizium* spp., via tratamento de sementes (Distância Euclidiana média como medida de dissimilaridade e método da média como estratégia de agrupamento); b) análise de componentes principais entre variáveis da composição química de plantas de *U. brizantha* inoculadas com os diferentes isolados de *Metarhizium* spp.
 Nota: Carot = Carotenoides; CIA = Clorofila A; CIB = Clorofila B.

Análises de correlação simples entre parâmetros do crescimento de *U. brizantha* cv. MG5 inoculadas com diferentes isolados de *Metarhizium* spp. e componentes químicos analisados não mostrou uma clara evidência de correlação. Assim, análise de correlação multivariada foi realizada e mostrou uma correlação positiva entre parâmetros do crescimento (altura de planta, comprimento da maior folha, comprimento de raízes e massa fresca e seca da parte aérea e radicular) de *U. brizantha* com os teores de pigmentos fotossintéticos analisados e com os teores de P e, em menor extensão, com os teores de N e Zn (Figura 11).

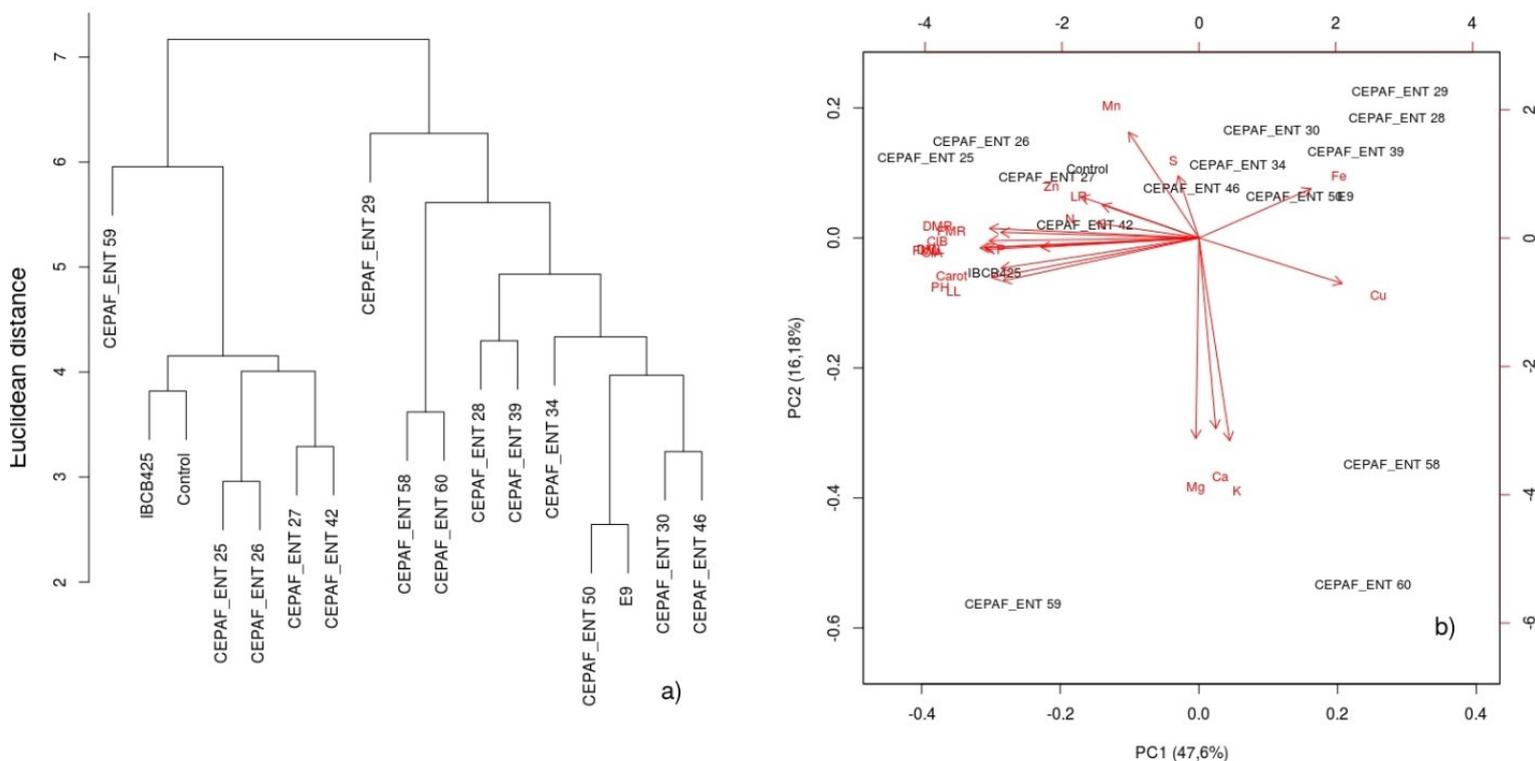


Figura 11. a) Dendrograma obtido a partir de análise de agrupamento com base na similaridade no teor de macro e micronutrientes e de pigmentos fotossintéticos (clorofila a e b e carotenoides) e parâmetros do crescimento de plantas de *Urochloa brizantha* cv. MG5 inoculadas com diferentes isolados de *Metarhizium* spp., via tratamento de sementes (Distância Euclidiana média como medida de dissimilaridade e método da média como estratégia de agrupamento); b) análise de componentes principais entre variáveis de crescimento de *U. brizantha* e teores de componentes químicos analisados. Nota: Carot = Carotenoides; DMR = Massa seca Raízes; FMR = Massa fresca Raízes; PH = Altura de planta; LL = Comprimento da maior folha; RL: Comprimento de raízes; FSW = Massa fresca parte aérea; ADW = Massa seca parte aérea.

2.5.3 Colonização endofítica e recuperação dos isolados selecionados a partir do substrato

A colonização endofítica ocorreu em todas as partes de plantas de *U. brizantha* avaliadas (raiz, colmo e folha), porém com frequências distintas de acordo com o isolado de *M. anisopliae* selecionado utilizado no tratamento de sementes e tempos de avaliação (Tabela 3). De modo geral, a maior frequência inicial de colonização foi observada em colmos, independentemente do isolado testado, sendo que uma redução da taxa de reisolamento foi observada com o decorrer dos tempos de avaliação (Tabela 3).

Tabela 3. Frequências de ocorrência (%) de isolados pré-selecionados de *Metarhizium anisopliae* em amostras de raiz, colmo e folha de *Urochloa brizantha* cv. MG5 e número de unidades formadoras de colônia (UFCs) no substrato dos vasos após 10, 20 e 40 dias da germinação das sementes tratadas com diferentes isolados.

Isolados	10 dias				20 dias				40 dias			
	Raiz (%)	Colmo (%)	Folha (%)	UFC (1x10 ²)	Raiz (%)	Colmo (%)	Folha (%)	UFC (1x10 ²)	Raiz (%)	Colmo (%)	Folha (%)	UFC (1x10 ²)
CEPAF_ENT 25	32,50	42,50	27,50	2,75	2,50	0,00	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00	70,50
CEPAF_ENT 26	35,00	67,50	32,50	72,50	25,00	10,00	5,00	85,00	20,00	12,50	5,00	161,75
CEPAF_ENT 27	35,00	87,50	45,00	274,00	25,00	45,00	2,50	411,00	42,50	37,50	22,50	228,00
CEPAF_ENT 42	22,50	67,50	20,00	466,00	35,00	40,00	15,00	536,00	32,50	5,00	2,50	248,50
CEPAF_ENT 59	27,50	37,50	15,00	81,00	2,50	15,00	2,50	133,00	12,50	5,00	2,50	122,50
E9	37,50	67,50	35,00	553,00	77,50	87,50	27,50	627,00	32,50	5,00	0,00	342,75
IBCB425	2,50	37,50	10,00	57,50	30,00	27,50	7,50	92,00	5,00	2,50	0,00	56,50
Controle	32,50	42,50	27,50	2,75	2,50	0,00	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00	70,50

As maiores taxas de colonização dos tecidos das plantas inoculadas foram observadas aos 10 dias após o tratamento com os distintos isolados de *M. anisopliae*, com uma média geral de amostras colonizadas de 58,21% dos fragmentos de colmo, 27,5% das raízes e 26,42% das folhas. Por outro lado, aos 20 dias a taxa de recuperação média foi de 32,14% nos colmos, 28,21% nas raízes e 8,92% nas folhas, atingindo os menores valores aos 40 dias após a inoculação, com uma taxa de recuperação média entre todos os isolados de 9,64% nos colmos, 20,71% nas raízes e 4,64% nas folhas. Em relação aos isolados avaliados, as maiores taxas de colonização endofítica, independentemente da parte da planta, foram verificadas com a aplicação do isolado CEPAF_ENT 59 (39,16% de amostras colonizadas), seguido pelo CEPAF_ENT 27 (33,61%), CEPAF_ENT 26 (30,83), CEPAF_ENT 25 (19,44%), E9 (16,11%), CEPAF_ENT 42 (15,55%) e, por último, o isolado comercial IBCB 425, com 13,61% de amostras colonizadas.

Apesar das diferenças observadas entre tratamentos e tempos de amostragem, todos os isolados foram recuperados do substrato de cultivo das plantas de *U. brizantha* (Tabela 3), demonstrando a persistência dos mesmos ao longo do período avaliado. Com exceção do isolado E9, o número de unidades formadoras de colônias (UFCs) foi maior após 20 dias da inoculação em todos os isolados. Aos 40 dias, observou-se uma redução no número de UFCs, com exceção dos tratamentos constituídos pelos isolados CEPAF_ENT 42 e E9, na qual houve um maior número de UFCs inclusive em comparação com os valores obtidos aos 10 dias após a inoculação (Tabela 3).

2.5.4 Efeito dos isolados selecionados de *Metarhizium anisopliae* na germinação de sementes de *Urochloa brizantha*

De modo geral, o tratamento de sementes de *U. brizantha* com conídios dos isolados selecionados de *M. anisopliae* proporcionou aumentos significativos na germinação e crescimento das plântulas (Tabela 4). Três dos isolados testados de *M. anisopliae* (IBCB 425, CEPAF_ENT 25 e CEPAF_ENT 42) ocasionaram taxas de germinação superiores em relação ao controle (sem inoculação) após 21 dias do tratamento das sementes. O incremento na germinação das sementes de *U. brizantha* foi variável entre 27,27 e 32,83%. No mesmo período após a inoculação, somente dois dos isolados promoveram o crescimento das plântulas (CEPAF_ENT 25 e CEPAF_ENT 27) superior ao controle. A taxa de aumento do comprimento da parte aérea em relação ao controle foi de 17,11 e 18,25% para os isolados CEPAF_ENT 25 e CEPAF_ENT 27, respectivamente, ao passo que o comprimento radicular aumentou 17,29% e 19,40%, respectivamente.

Tabela 4. Taxa de germinação (%) de sementes de *Urochloa brizantha* cv. MG5 expostas aos conídios de isolados pré-selecionados de *Metarhizium anisopliae* e parâmetros de crescimento de plântulas em 3 tempos de avaliação.

Tratamentos	7dias			14 dias			21 dias		
	Germinação (%) ¹	Comprimento aéreo (cm) ²	Comprimento radicular(cm) ²	Germinação (%) ¹	Comprimento aéreo (cm) ²	Comprimento radicular(cm) ²	Germinação (%) ¹	Comprimento aéreo (cm) ²	Comprimento radicular(cm) ²
CEPAF_ENT 25	30,67±5,24 a	3,52±0,11	7,19±0,24 a	39,00±3,21 ab	6,29±0,31 a	9,01±0,35 ab	40,67±2,91 a	7,13±0,11 a	9,89±0,20 a
CEPAF_ENT 26	29,00±1,15 a	3,30±0,23	7,22±0,27 a	36,33±2,33 abc	6,27±0,51 a	9,40±0,53 a	37,33±2,40 ab	6,98±0,31 ab	9,61±0,51 ab
CEPAF_ENT 27	19,67±2,33 ab	3,01±0,20	6,95±0,43 a	34,00±1,15 abc	5,85±0,22 a	9,27±0,10 a	35,00±1,15 ab	7,23±0,15 a	10,15±0,11 a
CEPAF_ENT 42	30,00±3,79 a	3,41±0,30	6,47±0,17 a	43,33±2,73 a	5,36±0,06 ab	7,77±0,09 bc	43,67±2,40 a	6,35±0,19 abc	8,41±0,12 c
CEPAF_ENT 59	13,33±4,41 b	2,67±0,36	6,29±0,38 ab	34,00±3,79 abc	4,47±0,38 b	7,43±0,31 c	35,00±2,89 ab	5,60±0,19 c	8,54±0,04 bc
E9	23,33±2,19 ab	2,99±0,12	6,44±0,15 a	31,00±1,15 bc	5,17±0,37 ab	7,81±0,22 bc	31,00±1,15 b	6,20±0,49 abc	7,70±0,38 c
IBCB425	27,33±2,33 a	2,57±0,06	5,12±0,29 b	40,33±1,67 ab	5,33±0,32 ab	7,28±0,41 c	40,33±1,67 a	5,86±0,32 bc	7,94±0,15 c
Controle	23,67±1,67 ab	3,10±0,16	6,78±0,14 a	27,33±2,67 c	5,52±0,14 ab	7,89±0,13 bc	29,33±1,20 b	5,91±0,18 bc	8,18±0,12 c
F	3,3174	2,4213 ^{ns}	5,9573	4,2942	3,5847	7,8205	5,6065	5,5248	14,057
gl	7, 16	7, 16	7, 16	7, 16	7, 16	7, 16	7, 16	7, 16	7, 16
valor de p	0,02226	0,06779	0,001534	0,007515	0,01633	0,0003474	0,002095	0,002256	<0,0001

¹Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente (GLM com distribuição quasibinomial seguido por teste *post hoc* Tukey, p>0,05);

²Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente (GLM com distribuição Gaussiana seguido por teste *post hoc* Tukey, p>0,05);

^{ns} Não significativo (GLM com a distribuição Gaussiana, p>0,05).

2.6 DISCUSSÃO

Houve uma pronunciada ação promotora de crescimento causada por isolados de *Metarhizium* spp. em plantas de *U. brizantha* cv. MG5, a gramínea forrageira mais utilizada no Brasil (Jank et al., 2014; Congio et al., 2020). Este é o primeiro relato da interação protooperativa entre um fungo entomopatogênico e uma espécie do genero *Urochloa*. Tais resultados indicam, ainda, que a seleção e utilização de isolados nativos pode ser uma estratégia promissora em agroecossistemas pastoris, compondo práticas integradas ao controle de pragas que também estimulam o crescimento e a produtividade das plantas forrageiras. Nossos resultados demonstram não apenas a colonização endofítica bem-sucedida, mas também um efeito promotor de crescimento, expresso por meio do aumento da biomassa de raízes e partes aéreas de plantas colonizadas. Os isolados nativos de *Metarhizium* spp., obtidos de áreas de pastagens de Santa Catarina, Brasil, que demonstraram os resultados mais promissores e consistentes em relação ao crescimento de *U. brizantha* foram CEPAF_ENT 25, CEPAF_ENT 26, CEPAF_ENT 27, CEPAF_ENT 42, CEPAF_ENT 59 e o isolado comercial IBCB425, os quais podem ser utilizados na formulação de inoculantes biológicos comerciais para o tratamento de sementes de *U. brizantha*.

Após 45 dias (*endpoint* do bioensaio), plantas de *U. brizantha* originadas de sementes tratadas com os isolados mais promissores de *Metarhizium* spp. apresentaram maiores alturas, tamanhos de folhas e raízes e biomassa radicular. Efeitos semelhantes foram encontrados por Kabaluk e Ericsson (2007), que verificaram maiores produtividades de plantas de milho inoculadas via tratamento de sementes, com conídios de *Metarhizium brunneum* (Metsc.) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae). Ahmad (2020b) verificou incrementos significativos no crescimento de *Secale cereale* L. (Poaceae) e outras plantas de cobertura expostas a *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch. (Hypocreales: Clavicipitaceae), atribuindo o maior crescimento à associação planta-fungo estabelecida. A habilidade de diferentes espécies de fungos entomopatogênicos em se estabelecerem como endofíticos e promoverem o crescimento vegetal vem sendo abordada para várias culturas agrícolas (Jaber e Enkerli, 2017; Canassa et al., 2019; Ramos et al., 2020), com resultados bastante promissores.

Apesar de estudos mais profundos serem ainda necessários para melhor compreender tal interação, algumas pesquisas tem indicado que o efeito bioestimulante é decorrente da maior produção de ácidos orgânicos e fitohormônios em plantas colonizadas endofiticamente (Luz, 2006; Behie et al., 2017; Liu et al., 2017). Liao et al. (2017) observaram indícios de que *M. robertsii* é capaz de produzir auxina ou influenciar os mecanismos vegetais responsáveis por sintetizar esse hormônio. Entretanto, ainda não existe um consenso se os fitohormônios induzidos (p. ex.: ácido

salicílico, ácido abscísico, auxinas e ácido jasmônico) em plantas colonizadas são produzidos como uma resposta imune à presença do fungo entomopatogênico endofítico ou se o próprio endófito que os produz (St Leger e Wang 2020; Hu e Bidochka, 2021). Além dos efeitos relacionados a fisiologia interna dos vegetais, estudos que abordam essa associação protocooperativa sugerem um maior aproveitamento dos nutrientes presentes no substrato, devido a associação entre raízes e hifas fúngicas, que aumentam a área de solo a ser explorada (Bruck, 2009; Liao et al., 2014). Nossos resultados indicaram uma correlação positiva entre parâmetros do crescimento de plantas inoculadas de *U. brizantha* com os teores de pigmentos fotossintéticos analisados e de N, P e Zn para os isolados mais promissores, com exceção do isolado CEPAF_ENT 59. Assim, em hipótese, tais isolados podem estar contribuindo para uma melhor nutrição das plantas inoculadas e outros mecanismos (p. ex.: síntese de fitohormônios) podem estar relacionados com os efeitos observados a partir da aplicação do isolados fúngicos.

A inoculação via deposição dos conídios diretamente sobre as sementes, durante a semeadura, se mostrou um método eficaz para promover a colonização endofítica de plantas de *U. brizantha*. Essa estratégia de inoculação no momento de implantação da cultura (aplicação no sulco de semeadura) pode propiciar que *Metarhizium* seja um dos primeiros colonizadores da rizosfera e também das raízes. As sementes já se mostraram importantes veículos de introdução de uma diversidade de microrganismos benéficos, incluindo fungos entomopatogênicos (Leger, 2008). Ahmad et al. (2020) inocularam sementes de milho com conídios de *M. robertsii*, e observaram maiores produtividades das plantas colonizadas endofiticamente em relação as não inoculadas.

O sucesso da associação entre plantas e fungos entomopatogênicos é variável de acordo com a concentração do inóculo, fenologia das plantas, características do substrato, métodos de inoculação e, principalmente, a compatibilidade entre a cepa fúngica aplicada e a cultivar da espécie vegetal em estudo (Bemisile et al., 2018). Canassa et al. (2020) observaram aumentos significativos na produtividade de uma cultivar (Albion) de morango [*Fragaria x ananassa* Duch. (Rosaceae)] inoculada com isolados de fungos entomopatogênicos. Entretanto, ao inocular os mesmos isolados em outra cultivar (Pircinque), não se observaram diferenças significativas no crescimento das plantas. No mesmo estudo, os autores verificaram que apesar de alguns isolados proporcionarem incremento na produtividade de uma cultivar de morangueiro, alguns reduziram o desempenho das plantas inoculadas com seus conídios. Tal resultado também foi observado em nosso estudo, visto que foi verificado uma significativa variabilidade na ação promotora de crescimento entre os diferentes isolados de *Metarhizium* spp. testados. Assim, a seleção de isolados mais efetivos é uma etapa primordial para o desenvolvimento de produtos bioestimulantes à base desses

microrganismos, levando em consideração as especificidades da interação com a planta hospedeira a ser tratada (Jaber e Ownley, 2018).

Variações na intensidade e frequência da colonização endofítica de *M. anisopliae* nas diferentes partes de plantas de *U. brizantha* foram observadas no presente estudo. Estruturas fúngicas de *Metarhizium* foram verificadas com maior frequência nos colmos das plantas de *U. brizantha*, contrariando os relatos de que esse gênero é exclusivamente um endófito de raízes ou que órgãos inoculados com os conídios são os que apresentam maiores percentuais de colonização (Behie et al., 2015; Klingen et al., 2015; Greenfield et al., 2016; Russo et al., 2019). Isso ocorreu, provavelmente, devido que as plantas utilizadas possuíam apenas um colmo, que foi utilizado para o isolamento, ao passo que as raízes e folhas eram mais numerosas, aumentando a possibilidade de ser plaqueado um fragmento sem a presença do fungo em virtude da distribuição desuniforme dos propágulos no interior da planta. Similarmente, Jaber e Enkerli (2016) verificaram maiores taxas de colonização endofítica nos tecidos do caule das plantas, mesmo que a inoculação tenha sido realizada através da pulverização das folhas de *Vicia faba* L. (Fabaceae). A diferença na colonização entre as partes vegetais também pode ser resultado das distintas condições microbianas e fisiológicas existentes entre os tecidos das distintas espécies vegetais, que podem favorecer ou não a permanência endofítica do fungo. Além disso, a possibilidade de movimentação do fungo pelos tecidos das plantas é uma outra hipótese (Quesada Moraga et al., 2009; Elena et al., 2011; Akutse et al., 2013; Batta, 2013; Jaber e Enkerli, 2016; Kaushik e Dutta, 2016; Russo et al., 2019).

É importante destacar, ainda, que a porcentagem de recuperação dos isolados nas folhas e colmos reduziu com o passar do tempo, apresentando as menores taxas após 40 dias das inoculações. A redução do isolamento de fungos entomopatogênicos de tecidos vegetais ao longo do tempo também foi verificada em outras plantas hospedeiras, como em ervilha, centeio e canola (Ahmad et al., 2020), soja (Ahmad et al., 2020), feijão (Parsa et al., 2013), algodão, trigo, milho, tomate e abóbora (Gurulingappa et al., 2010). Esse declínio pode ser atribuído à competição do fungo inoculado com os demais endofíticos naturalmente presentes na planta (Posada et al., 2007). Ademais, o crescimento vegetativo pode ser mais veloz do que a expansão endofítica das hifas fúngicas, dificultando o isolamento do fungo durante o pleno crescimento da planta hospedeira. Além disso, a redução na taxa de recuperação foi mais tênue nas raízes do que nas outras partes de *U. brizantha* ao longo dos períodos avaliados, possivelmente devido a melhor adaptação de *Metarhizium* na rizosfera, que propicia um ambiente adequado para seu desenvolvimento e permanência por maiores períodos (Greenfield et al., 2016; Russo et al., 2019).

De modo geral, nossos resultados indicam os benefícios da utilização de *Metarhizium* no estabelecimento e manejo de pastagens constituídas por *U. brizantha*, não somente visando ao manejo do complexo de cigarrinhas-das-pastagens (efeito biopesticida) mas também como promotores de crescimento. Nesse contexto, os isolados nativos CEPAF_ENT 25, CEPAF_ENT 26, CEPAF_ENT 27, CEPAF_ENT 42, CEPAF_ENT 59 e o isolado comercial IBCB425 são os mais promissores para o desenvolvimento de inoculantes biológicos para o tratamento de sementes de *U. brizantha*. No entanto, testes em condições de campo são ainda necessários para melhor elucidar os benefícios dessa interação, especialmente em condições com amplas variações dos fatores do ambiente e competição com a comunidade microbiana nativa presente nos solos dos diferentes agroecossistemas pastoris.

2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad, I., Jiménez-Gasco, M.D.M., Luthe, D.S., Barbercheck, M.E., 2020. Systemic colonization by *Metarhizium robertsii* enhances cover crop growth. *J. Fungus*. 6(2): 64.

Akutse, K.S., Maniania, N.K., Fiaboe, K.K.M., Berg, J.D., Ekesi, S., 2013. Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on the life-history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Fungal Ecol.* 6(4). 293-301.

Batta, Y.A., 2013. Efficacy of endophytic and applied *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against larvae of *Plutella xylostella* L. (Yponomeutidae: Lepidoptera) infesting *Brassica napus* plants. *J. Crop. Prot.* 44, 128–134.

Bataglia, O.C., Furlani, A.M.C., Teixeira, J.P.F., Furlani, P.R. Galo, J.R., 1983. Métodos de análise química de plantas [Boletim técnico]. Campinas: Instituto Agrônômico.

Barelli, L., Moonjely, S., Behie, S.W., 2016. Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. *Plant Mol. Biol.* 90(6), 657-664.

Bartlett, M.S., 1937. Properties of sufficiency and statistical tests. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A-Mathematical and Physical Sciences*, 160(901), 268-282.

Behie, S.W., Moreira, C.C., Sementchoukova, I., Barelli, L., Zelisko, P.M., Bidochka, M.J., 2017. Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. *Nat. Commun.* 8, 142-145.

Bernardo, C.C., Barreto, L.P., Silva, C.D.S., Luz, C., Arruda, W., Fernandes, É.K., 2018. Conidia and blastospores of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* sl: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. *Ticks. Tick. Borne. Dis.* 9(5), 1334-1342.

- Behle, R.W., Jackson, M.A., 2014. Effect of fermentation media on the production, efficacy, and storage stability of *Metarhizium brunneum* microsclerotia formulated as a prototype granule. *J. Econ. Entomol.* 107 (2), 582–590.
- Bischoff, J.F., Rehner, S.A., Humber, R.A., 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512–530.
- Brunner-Mendoza, C., Reyes-Montes, M.R., Moonjely, S., Bidochka, M.J., Toriello, C., 2018. A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. *Biocontrol. Sci. Technol.*, 1–20.
- Bruck, D.J., 2009. Fungal entomopathogens in the rhizosphere. *The ecology of fungal entomopathogens*. Springer. 77, 103-112.
- Box, G. E., & Cox, D. R. (1964). An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 26(2), 211-243.
- Canassa, F., D’Alessandro, C.P., Sousa, S.B., Demétrio, C.G.B., Meyling, N.V., Klingen, I., Delalibera, I., 2019. Fungal isolate and crop cultivar influence the beneficial effects of root inoculation with entomopathogenic fungi in strawberry. *Pest. Manag. Sci.* 76(4), 1472-1482.
- Congio, G.F.S., Corsi, M., Almeida, P.C., Goulart, R.D.C.D., Passos, L.P., Kopp, M.M., 2012. Rebrotado do capim-marandu submetido ao ataque de cigarrinhas. *Arquivos do Instituto Biológico*, 79, 389-396.
- Driver, F., Milner, R.J., Trueman, J.W.H., 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol. Res.* 104(2), 134–150.
- Dias-Filho, M.B., 2014. Diagnóstico das pastagens no Brasil. Embrapa Amazônia. Oriental-Documentos (INFOTECA-E). Censo agropecuário, IBGE. 2017. Disponível em https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3093/agro_2017_resultados_preliminar.es.pdf. Accessed June 2021.
- Elena, G.J., Beatriz, P.J., Alejandro, P., Lecuona, R., 2011. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. *Adv Biol Res.* 5, 22–27.
- Flores, E.F., Cargnelutti, J.F., Monteiro, F.L., Bauermann, F.V., Ridpath, J.F., Weiblen, R., 2018. A genetic profile of bovine pestiviruses circulating in Brazil (1998–2018). *Anim. Health Res. Rev.* 19(2), 134-141.
- Garrido-Jurado, I., Montes-Moreno, D., Sanz-Barrionuevo, P., Quesada-Moraga, E., 2020. Delving into the Causes and Effects of Entomopathogenic Endophytic *Metarhizium brunneum* Foliar Application-Related Mortality in *Spodoptera littoralis* larvae. *Insects.* 11(7), 429.
- Greenfield, M., Gómez Jiménez, M.I., Ortiz, V., Veja, F.E., Kramer, M., Parsa, S., 2016. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Bio. Contl.* 95, 40-48.

Gurulingappa, P., Sword, G.A., Murdoch, G., McGee, P.A., 2010. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. *BioControl*. 55: 34–41.

Hu S, Bidochka M.J., 2021. Root colonization by endophytic insect-pathogenic fungi. *J. app. Microbiol.* 130(2), 570–581.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística., 2018. Pesquisa pecuária municipal. Available from: <http://www.ibge.gov.br/>. Accessed March 2021.

Jaber, L.R., Ownley, B.H., 2018. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Bio. Control*. 116, 36-45.

Jaber, L.R., Enkerli, J., 2017. Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth? *Biocontrol Sci. Technol.* 27(1), 28-41.

Jank, L., Barrios, S.C., do Valle, C.B., Simeão, R.M., Alves, G.F., 2014. The value of improved pastures to Brazilian beef production. *Crop. Pasture. Sci.* 65(11), 1132-1137.

Kabaluk, J.T., Ericsson, J.D., 2007. Seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. *J. Agron.* 99, 1377-1381.

Kago, L., Njuguna, J., Njarui, D.M.G., Ghimire, S.R., 2016. Fungal endophyte communities of *Brachiaria* grass (*Brachiaria* spp.) in Kenya. In: *Climate Smart Brachiaria Grasses for Improving Livestock Production in East Africa – Kenya Experience*, 150.

Kaushik, H., Dutta, P., 2016. Establishment of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogen as endophyte for biological control in tea. *Res. Crops.* 17: 375–387.

Kepler, R.M., Rehner, S.A., 2013. Genome-assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. *Mol. Ecol. Res.* 13(2), 210-217.

Klingen, I., Westrum, K., Meyling, N.V., 2015. Effect of Norwegian entomopathogenic fungal isolates against *Otiorhynchus sulcatus* larvae at low temperatures and persistence in strawberry rhizospheres. *Bio. Control*. 81, 1–7.

Liao, X., 2014. The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*, 98(16), 7089-7096.

Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophyll fluorescence signatures of leaves during the autumnal chlorophyll breakdown. *Journal of Plant Physiology*, 131(2), 101-110.

Liu, S.F., Wang, G.J., Nong, X.Q., Liu, B., Wang, M.M., Li, S.L., Cao, G.C., Zhang, Z.H., 2017. Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* promotes the early development of peanut root. *Ann. Plant. Sci.* 53, 101–107.

Lopez, D.C., Sword, G.A., 2015. 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*). *Bio. Control.* 89, 53-60.

Lovatto, M., Ribeiro, L.P., 2017. Manejo das cigarrinhas-das-pastagens com fungos entomopatogênicos. *Agro. Catarinense*, 30 (2), 42-46.

Luz, J.S. Oliveira S.R.L. Silveira, E.B. Cavalcante, U.M.T., 2016. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. *Revista Caatinga*, 19(2), 128-134.

Mantzoukas, S., Eliopoulos, P.A., 2020. Endophytic entomopathogenic fungi: A valuable biological control tool against plant pests. *App. Sci.* 10(1), 360.

Murphy, J. Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta.* 27, 31-36.

Nelder, J. A., & Wedderburn, R. W. (1972). Generalized linear models. *Journal of the Royal Statistical Society: Series A (General)*, 135(3), 370-384.

Oliveira, D.G.P., Pauli, G., Mascarin, G.M., Delalibera, I., 2015. A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. *J. Microbiol. Methods.*, 119, 44-52.

Parsa, S., Ortiz, V., Vega, F.E., 2013. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. *JoVE.* 74, 50360.

Posada, F., Aime, M.C., Peterson, S.W., Rehner, S.A., Vega, F.E., 2007. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycol. Res.* 111(6): 748-757.

Quesada Moraga, E., Muuñoz, J.L., Santiago, C.A., 2009. Systemic Protection of *Papaver somniferum* L. against *Iraella luteipes* (Hymenoptera: Cynipidae) by an endophytic strain of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Environ. Entomol.* 38, 723-730.

Ramos, Y., Taibo, A.D., Jiménez, J.A., Portal, O., 2020. Endophytic establishment of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in maize plants and its effect against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Egypt. J. Biol. Pest Control.* 30(1), 1-6.

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Regras para análise de sementes. 2009. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 395.

Russo, M.L., Scorsetti, A.C., Vianna, M.F., Allegrucci, N., Ferreri, N.A., Cabello, M.N., Pelizza, S.A., 2019. Effects of endophytic *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) on biological, reproductive parameters and food preference of the soybean pest *Helicoverpa gelotopoeon*. *J. King Saud Univ. Sci.* 31, 1077–1082.

- Samson, R.A., Evans, H.C., Latgé, J.P., 2013. Atlas of entomopathogenic fungi. SSBM.
- Schultz, B., Guske, S., Dammann, U., Boyle, C., 1998. Endophyte–host interactions II. Defining symbiosis of the endophyte–host interaction. *Symbiosis*, 25, 213-227.
- Shapiro, S.S., Wilk, M.B., 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591-611.
- Silva, F.C., 2009. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Embrapa, Brasil.
- Schöbel, C., Carvalho, G.S., 2021. The “State of Art” of *Mahanarva* (Hemiptera: Cercopidae) research. An economically important New World spittlebug genus. *App. Entomol. Zoo.* 56(3), 299-309.
- St. Leger, R.J., 2008. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *J. Invertebr. Pathol.* 98(3), 271–276.
- St Leger, R.J., Wang, J.B., 2020. *Metarhizium*: jack of all trades, master of many. *Biol. Open.* 10(12), 200307.
- Tedesco, M.J., Gianello, C., Bissani, C.A., Bohnen, H., Volkweiss, S.J., 1995. Análise de solo, plantas e outros materiais. Tesis, Porto Alegre: Universidade do Rio Grande do Sul.
- USDA (2019) Livestock and poultry: world markets and trade. Available from https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf. Accessed 15 April 2021

1 **Material Suplementar.**

2 **MS-Tabela 1.** Teores de macro e micronutrientes (g kg⁻¹) e de pigmentos fotossintéticos de folhas de plantas de *Urochloa brizanta* cv. MG5
 3 expostas a isolados de *Metarhizium* sp.

4

Tratamentos	Nutrientes (g/kg)										Clorofila (mg g ⁻¹) ¹		
	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Mn	Zn	Cu	a	b	Carotenoides
CEPAF_ENT 25	7,47	4,60	31,32	7,60	1,41	0,11	1087,99	182,10	28,29	4,52	0,57±0,03 a	0,26±0,03 a	0,17±0,01 a
CEPAF_ENT 26	7,47	4,10	30,64	8,40	1,52	0,78	976,36	191,67	28,59	10,26	0,50±0,03 b	0,18±0,03 a	0,17±0,01 a
CEPAF_ENT 27	7,47	4,49	32,47	9,56	1,42	0,94	755,29	183,17	22,65	4,35	0,45±0,06 b	0,14±0,02 b	0,15±0,02 b
CEPAF_ENT 28	7,00	3,84	29,22	8,99	1,28	0,62	1019,32	164,65	17,84	6,69	0,29±0,03 c	0,07±0,01 b	0,09±0,01 b
CEPAF_ENT 29	6,65	3,74	30,60	10,20	1,36	0,96	2695,27	218,28	26,82	25,81	0,36±0,04 c	0,08±0,03 b	0,13±0,01 b
CEPAF_ENT 30	5,83	3,48	28,78	7,36	1,24	0,28	1266,08	185,77	17,16	10,61	0,36±0,03 c	0,08±0,01 b	0,13±0,01 b
CEPAF_ENT 34	6,77	3,65	29,40	10,91	1,28	0,89	1562,24	180,68	18,43	16,84	0,42±0,01 c	0,11±0,01 b	0,15±0,01 a
CEPAF_ENT 39	8,40	4,28	32,05	9,54	1,35	0,41	1776,24	137,06	26,33	17,05	0,31±0,04 c	0,06±0,02 b	0,12±0,01 b
CEPAF_ENT 42	7,47	4,42	29,90	10,30	1,44	0,78	1038,14	147,20	28,34	10,94	0,44±0,01 b	0,14±0,02 b	0,15±0,01 a
CEPAF_ENT 46	5,60	3,82	27,55	9,32	1,35	0,75	1084,74	138,04	24,19	9,96	0,42±0,03 c	0,11±0,02 b	0,14±0,01 b
CEPAF_ENT 50	5,83	3,83	28,34	9,45	1,32	0,00	1468,15	160,10	25,55	15,05	0,36±0,03 c	0,05±0,01 b	0,14±0,01 b
CEPAF_ENT 58	5,60	4,08	115,59	12,96	3,82	0,00	1235,08	102,84	22,59	16,41	0,32±0,03 c	0,04±0,01 b	0,12±0,01 b
CEPAF_ENT 59	7,00	4,26	120,59	15,11	7,84	0,58	1103,42	156,94	22,44	15,52	0,53±0,04 a	0,20±0,03 a	0,18±0,01 a
CEPAF_ENT 60	7,00	3,74	121,71	15,68	6,39	0,11	1251,90	133,57	19,45	16,51	0,34±0,04 c	0,06±0,02 b	0,13±0,01 b
E9	5,60	3,89	30,36	7,85	1,28	0,04	1255,85	105,49	24,29	14,34	0,38±0,05 c	0,08±0,03 b	0,13±0,01 b
IBCB 425	7,93	4,75	33,77	12,21	1,49	0,03	1204,11	142,00	31,40	5,47	0,58±0,05 a	0,23±0,04 a	0,17±0,01 a
Controle	7,00	4,70	33,28	9,10	1,63	0,00	1452,99	205,30	28,36	6,39	0,50±0,02 b	0,13±0,06 b	0,18±0,03 a

5 ¹ Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Skott-Knott (p < 0,05).

CAPÍTULO 3

Efeito da inoculação de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Clavicipitaceae) no desenvolvimento vegetal de mudas de gramíneas forrageiras

3.1 RESUMO

Pouco se sabe sobre a relação entre os fungos entomopatogênicos aplicados massalmente em áreas de pastagens e as gramíneas forrageiras. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da inoculação de raízes de plantas das espécies *Axonopus catharinensis* cv. SCS 315, *Hermatria altissima* cv. Florida e *Cynodon. dactylon* cv. Tifton 85 com 5 isolados nativos e 2 comerciais de *Metarhizium anisopliae*. A ação desse fungo se mostrou espécie-específica, sendo possível observar uma notável distinção entre os impactos de sua inoculação em cada espécie. A forrageira *A. catharinensis* se mostrou positivamente afetada, ao passo que a espécie *H. altissima* se mostrou pouco responsiva e até mesmo prejudicada. Considerando todas as variáveis do crescimento (parte aérea e radicular) de plantas inoculadas, os isolados CEPAF_ ENT 25, CEPAF_ ENT 27, e o IBCB 425 destacaram-se como os tratamentos mais promissores para *A. catharinensis* e *C. dactylon*. O método de inoculação via tratamento de raízes se mostrou eficaz para estabelecer a relação entre o fungo e as plantas, visto que testes de colonização endofítica indicaram a presença de *Metarhizium* spp. em todos os órgãos vegetais avaliados (raiz, colmo e folha), com maior frequência nas raízes. Além disso, todos os isolados foram recuperados do substrato de cultivo das plantas, entretanto, a concentração de conídios foi sendo reduzida com o passar do tempo. O estudo demonstra a grande variabilidade existente no efeito promissor de crescimento entre genótipos de uma mesma espécie de fungo entomopatogênicos, além de diferentes responsabilidades entre as espécies de plantas forrageiras. Os isolados mais promissores de *M. anisopliae* se mostraram aptos para compor novos testes laboratoriais e de campo a fim de elaborar inoculantes biológicos com duplo propósito a serem utilizados em ecossistemas pastoris.

Palavras-chave: Promoção de crescimento; Inoculantes biológicos; Pastagens; Fungos entomopatogênicos.

3.2 ABSTRACT

Little is known about the relationship between entomopathogenic fungi applied mass in pasture areas and forage grasses. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of inoculation of plant roots of the species *Axonopus catharinensis* cv. SCS 315, *Hermatiria altissima* cv. Florida and *Cynodon. dactylon* cv. Tifton 85 and Catarina Gigante with 5 native and 2 commercial isolates of *Metarhizium anisopliae*. The action of this fungus proved to be species-specific, and it was possible to observe a remarkable distinction between the impacts of its inoculation on each species. The forage *A. catharinensis* was positively affected, while the species *H. altissima* was unresponsive and even harmed. Considering all growth variables (shoot and root) of inoculated plants, the isolates CEPAF_ENT 25, CEPAF_ENT 27, and IBCB 425 stood out as the most promising treatments for *A. catharinensis* and *C. dactylon*. The inoculation method via root treatment proved to be effective in establishing the relationship between the fungus and the plants, as endophytic colonization tests indicated the presence of *Metarhizium* spp. in all evaluated plant organs (root, stem and leaf), more frequently in the roots. In addition, all isolates were recovered from the plant substrate, however, the conidia concentration was reduced over time. The study demonstrates the great variability existing in the promising effect of growth between entomopathogenic fungal genotypes of the same species, in addition to different responsiveness among forage plant species. The most promising isolates of *M. anisopliae* were able to compose new laboratory and field tests in order to develop biological inoculants with dual purposes to be used in pastoral ecosystems.

Keywords: Growth promotion; Biological inoculants; pastures; Entomopathogenic fungi.

3.3 INTRODUÇÃO

A estrutura fundiária da região Sul do Brasil é caracterizada por pequenos produtores familiares, sendo a segunda maior produtora de leite do país (IBGE 2018; Epagri, 2020). A busca por tecnificação e aprimoramento da atividade leiteira tem feito o setor crescer acima da média nacional nos estados dessa região, aumentando a demanda por novas tecnologias que otimizem o processo e garantam a qualidade de vida das famílias rurais envolvidas (Honorato et al., 2014). Sendo assim, a geração de inovações é essencial para subsidiar esse desenvolvimento e auxiliar na resolução das problemáticas atreladas a produção de animais de forma extensiva, tida como a base dos sistemas de produção leiteira na região (Honorato et al., 2014; Ribeiro e Cazarotto, 2019).

Um dos principais entraves observados por produtores nas pastagens perenes do sul do Brasil é a incidência de artrópodes pragas, como as espécies do complexo de cigarrinha-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae) (Lohmann et al., 2010; Chiaradia et al., 2013; Ribeiro e Cazarotto, 2019). Os danos causados por esses insetos nas plantas forrageiras reduzem a produção de matéria seca (danos quantitativos) bem como a qualidade nutricional (danos qualitativos), além de acelerarem processos de degradação (Congio et al., 2012; Congio et al., 2020; Schoebel e Carvalho, 2020). Com essa redução da capacidade de suporte, estes sistemas alcançam menores rentabilidades, visto que o desempenho produtivo das pastagens está intimamente relacionado com a produtividade animal e, conseqüentemente, com a eficiência do sistema (Congio et al., 2020).

Os principais inimigos naturais de cercopídeos em condições de campo são fungos entomopatogênicos, capazes de reduzir significativamente populações da praga em épocas favoráveis para epizootias (Ribeiro e Cazarotto, 2019). Isso vem sendo intensificado com a aplicação massal de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Clavicipitaceae), um microorganismo que naturalmente ocorre em áreas de pastagens e representa um elemento importante em práticas de manejo integrado de pragas (Vega, 2018; Sharma e Sharma, 2021). O uso de *M. anisopliae* vem paulatinamente crescendo devido ao aumento da disponibilidade de formulações comerciais registradas, possibilitando a utilização de produtos alternativos aos inseticidas sintéticos, que ainda representam a principal estratégia adotada no manejo de pragas agrícolas (Ribeiro e Cazarotto, 2018; Rembischevski e Caldas, 2018).

Diversos autores vêm demonstrando que além do efeito biopesticida, a aplicação de conídios de fungos entomopatogênicos em plantas agrícolas pode trazer outros

benefícios, capazes de gerar incrementos na produtividade (Branine et al., 2019; Canassa, 2019). Isso se deve a uma associação protooperativa que se forma pela colonização destes fungos na rizosfera e de forma endofítica nas plantas expostas, culminando em maior crescimento vegetal e resistência a pragas e fitopatógenos (Sasan e Bidochka, 2013; Jaber e Enkerli, 2017; Garrido-Jurado et al., 2020). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi dimensionar o efeito promotor de crescimento promovido por 5 isolados nativos e 2 comerciais de *Metarhizium anisopliae*. Inoculados a partir do tratamento de raízes de mudas em três espécies forrageiras amplamente utilizadas: *Axonopus catharinensis* cv. SCS 315, *Hermatria altissima* cv. Florida e *Cynodon. dactylon* cv. Tifton 85 e Catarina Gigante.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Isolados de *Metarhizium anisopliae*

Foram utilizados os isolados que obtiveram os melhores desempenhos na promoção de crescimento de *U. brizantha*, (CEPAF_ ENT 25; CEPAF_ ENT 26; CEPAF_ ENT 27; CEPAF_ ENT 42; CEPAF_ ENT 59) e dois isolados comerciais de *Metarhizium anisopliae* (IBCB425 e E9).

Tabela 1. Caracterização dos isolados fúngicos utilizados neste capítulo.

Nº do Isolado	Local de coleta	Espécie
EPAGRI_ ENT 25	Canoinhas	<i>Metarhizium anisopliae</i>
EPAGRI_ ENT 26	Alto da Bela Vista	<i>Metarhizium brunneum</i>
EPAGRI_ ENT 27	Campo Erê	<i>Metarhizium anisopliae</i>
EPAGRI_ ENT 42	Bom Retiro	<i>Metarhizium anisopliae</i>
EPAGRI_ ENT 59	Brunópolis	<i>Metarhizium anisopliae</i>
IBCB 425	Instituto biológico de São Paulo	<i>Metarhizium anisopliae</i>
E9	ESALQ-USP	<i>Metarhizium anisopliae</i>

3.4.2 Plantas forrageiras

As plantas utilizadas nos ensaios foram multiplicadas por estacas do colmo de matrizes sadias. Todas as estacas foram plantadas em tubetes contendo o substrato comercial Turfa Fertil[®], autoclavado em 3 ciclos de 120°C durante 1 h 20 min. As estacas

foram postas para enraizar em casa de vegetação com condições semi-controladas (26°C) e irrigação manual, realizada sempre que necessário (Figura 1). O critério de seleção para determinar quais plantas deveriam ser utilizadas nos bioensaios foi a importância econômica na Região Oeste de Santa Catarina (Jochims et al., 2017; Alexandre Ramos CooperAlfa – informação pessoal). Sendo assim, foram escolhidas as espécies *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85 e *Axonopus catharinensis* cv. SCS 315 Catarina Gigante e *Hermatryia altissima* cv. Florida.



Figura 1. Mudas das espécies de forrageiras obtidas a partir de estacas plantadas em tubetes e mantidas em casa de vegetação.

3.4.3 Obtenção dos conídios e preparo das suspensões.

A produção dos conídios foi feita por meio do processo de fermentação sólida de arroz. Para isso, conídios dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. foram retirados dos tubos criogênicos com glicerol 10%, mantidos no ultrafreezer (-80 °C) e inoculados em placas de Petri contendo 10ml de BDA (Batata, Dextrose e Ágar). Após 10 dias, as placas de Petri foram raspadas por uma espátula esterilizada e subsequente imersão em água destilada contendo Tween 80[®] 0,01% (v/v). Posteriormente, 2ml das suspensões foram inoculadas com pipetas estéreis, em tubos Schott individuais de 250ml, contendo 50g de arroz parboilizado autoclavado (120°C, 25 min). Após a inoculação, os tubos foram

incubados a 26°C e fotofase de 12h, a fim de que os fungos se multiplicassem e produzissem a quantidade necessária de conídios para os experimentos.

Depois da completa colonização do substrato, que acontecia aproximadamente 10 dias após as inoculações, foi feita a filtragem e separação dos conídios. Para tanto, adicionou-se 150 ml de água destilada esterilizada contendo 0,01ml de Tween 80[®], em cada tubo Schott, que foram depositados em uma mesa agitadora, por 30 min. Após esse período e dentro de uma câmara de fluxo laminar, os conídios foram obtidos por meio da filtragem da suspensão com auxílio de voais estéreis e depositados em Erlenmeyer estéril. As soluções obtidas foram agitadas em um vórtex e diluídas de forma seriada, com o objetivo de estimar as quantidades de conídios na suspensão por meio de um hemocítmetro, visualizado em microscópio óptico com aumento de 400x (Axio Scope A1, Zeiss I. Metrology, Alemanha). A concentração final foi ajustada pela adição de água destilada esterilizada até que se obtivesse suspensões com 1×10^8 conídios mL⁻¹, para utilização nos bioensaios.

3.4.4 Inoculação dos isolados fúngicos e ação promotora de crescimento nas mudas de forrageiras

Depois do enraizamento das estacas nos tubetes, em casa de vegetação, 80 mudas de cada espécie foram transferidas para o fitotron, com condições controladas (25°C, U.R.: 90±10% e fotofase: 12 h). A inoculação de 10 plantas por isolado deu-se por meio do método de tratamento de raízes, que consiste na retirada das plantas do tubete, lavagem

de suas raízes com água destilada esterilizada e subsequente imersão em tubos Falcon estéreis (Figura 2).

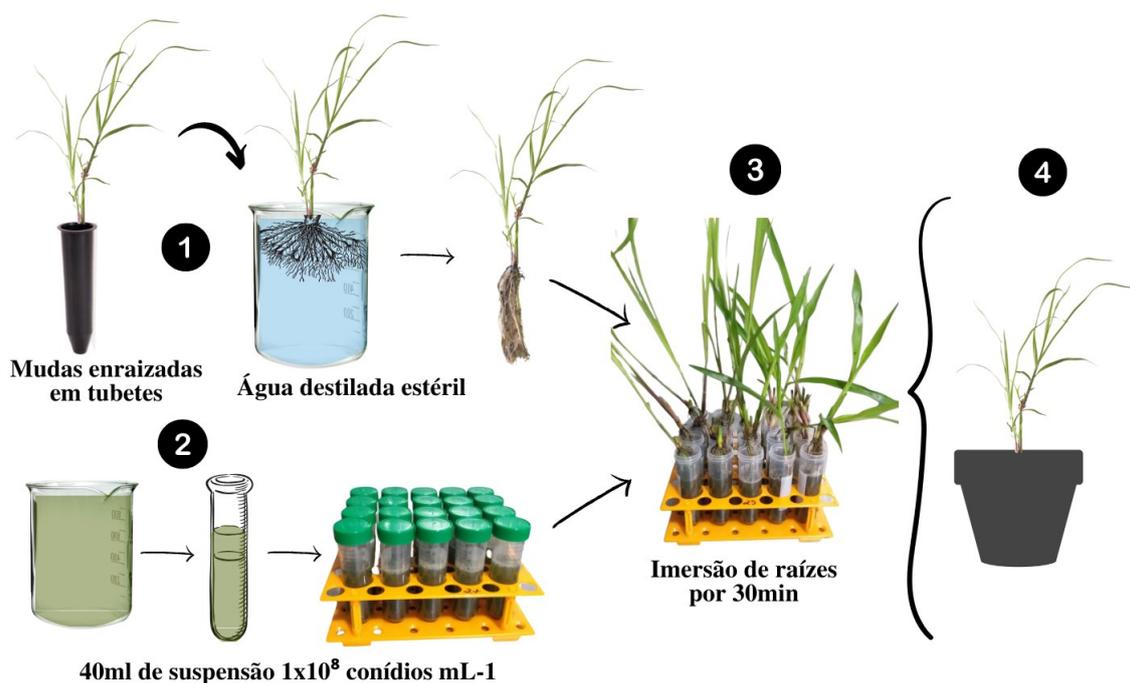


Figura 2. Esquema ilustrativo do processo de inoculação das raízes de mudas por meio da imersão de raízes em suspensão fúngica contendo 1×10^8 conídios mL^{-1} .

Cada tubo continha 30ml das respectivas suspensões de conídios dos 7 isolados, na concentração de 1×10^8 conídios mL^{-1} . No tratamento controle, foi utilizado somente água destilada estéril com 0,01% de Tween 80[®]. As plantas permaneceram com suas raízes imersas na suspensão durante 30 minutos, para posteriormente serem transplantadas em vasos n^o3 com capacidade de 1050ml, contendo substrato Turfa Fertil[®] autoclavado (3 ciclos de 120°C durante 1 h 20 min). A irrigação era feita a cada dois dias, ou sempre que necessário. Cada tratamento (7 isolados + o controle) era composto por 10 unidades experimentais (vasos), dispostos de forma aleatorizada dentro do fitotron (Figura 3).

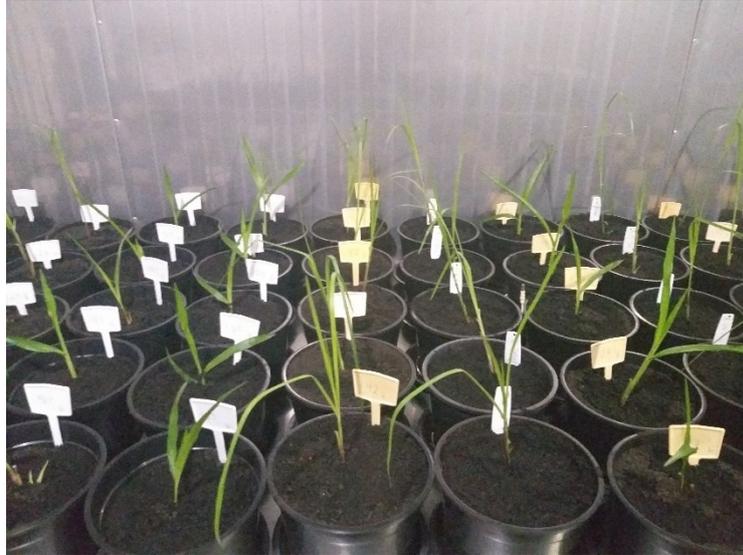


Figura 3. Mudas inoculadas das três espécies de forrageiras estabelecidas em substrato estéril, dentro de fitotron.

Após 35 dias, as plantas foram avaliadas, sendo quantificados parâmetros relacionados ao crescimento vegetal, como número de folhas e perfilhos, comprimento do maior colmo e da maior raiz, além da massa fresca e seca da parte aérea e raízes. A altura foi medida desde a base da planta até a ponta da última folha verdadeira mais longa, assim como as raízes, que foram medidas da base da planta até a extremidade da maior raiz. Para a pesagem das biomassas, a parte aérea foi cortada rente ao colo da planta e pesada em balança eletrônica (Unibloc AUY220, Shimadzu, Philippines), e posteriormente posta em saco de papel pardo armazenado em estufa a 60°C durante 7 dias. Após a secagem, as folhas e colmos foram novamente pesados na balança eletrônica. Para a pesagem das raízes, estas foram desenvasadas, intensamente lavadas em água para retirada do substrato, deixadas secar em temperatura ambiente por 6 horas e pesadas na balança eletrônica. Depois da pesagem úmida, as raízes foram ensacadas e postas na estufa (60°C por 7 dias), visando a desidratação dos tecidos e subsequente pesagem seca na balança eletrônica.

Os testes subsequentes não foram realizados com a *Hermatria florida*, em função da irrisória ação observada pelos isolados fúngicos nesta espécie de gramínea forrageira.

3.4.5 Confirmação da colonização endofítica pelo isolados fúngicos

A confirmação da colonização do fungo nos tecidos vegetais foi baseada em Parsa et al. (2013), com modificações. Para isso, 2 pedaços de folhas, caules e raízes

foram coletados de 4 plantas ao acaso, de cada um dos 7 isolados fúngicos, 10, 20 e 40 dias após a inoculação dos fungos. As estruturas vegetais foram separadamente lavadas com água destilada estéril, levadas para câmara de fluxo, e desinfestadas com imersão em álcool 70% por 2 min. Posteriormente, as partes vegetais foram imersas em hipoclorito de sódio a 2,5% por 3 min e novamente em álcool 70% por mais 1 min, finalizado com imersões de 1 min em três recipientes distintos contendo água destilada estéril. Em seguida, as amostras de cada órgão vegetal foram postas em placas de Petri estéreis, onde as bordas externas dos fragmentos foram excisadas e descartadas, visando eliminar a parte interna do tecido que entrou em contato com as substâncias desinfetantes.

Os pedaços vegetais remanescentes foram cortados em 10 partes (2cm/fragmento), com auxílio de um bisturi estéril, e transferidos para placas de Petri contendo 8mL de meio BDA seletivo (0,5 g/L de Ciclohexamida, 0,2 g/L de Cloranfenicol, 0,002% de princípio ativo Dodex 450SC (acetato de N- dodecil guanidínio) e 0,01 g/L de Cristal Violeta (Behie et al., 2015). As placas contendo os fragmentos de folhas, caules e raízes (separadamente) foram seladas com plástico filme e mantidas em uma câmara climática (26°C, com fotofase de 14h) durante 15 dias. A confirmação da colonização endofítica pelo fungo foi feita pela observação de estruturas fúngicas (conidióforo e conídios) características do *Metarhizium* sp. em microscópio óptico com aumento de 400x (Axio Scope A1, Zeiss I. Metrology, Alemanha) e identificação taxonômica de acordo com Driver et al. (2000) e Brunner-Mendoza et al. (2018).

Para verificar se o processo de limpeza das amostras foi eficiente, após a desinfestação superficial e eliminação das bordas, foi feita uma impressão do tecido vegetal esterilizado em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar), como proposto por Schultz et al. (1998). Posteriormente, caso fosse detectado o crescimento de microrganismos indesejados nestas placas, a amostra correspondente foi eliminada e substituída.

3.4.6 Persistência e produção de conídios dos isolados no substrato

Amostras do substrato das plantas utilizadas para os testes de colonização endofítica das espécies *C. dactylon* e *A. catharinensis*, foram coletadas e armazenadas em endoporfis esterilizados, em três intervalos: 10, 20 e 40 dias após a inoculação dos isolados fúngicos de *Metarhizium* sp.. Nestes tempos de avaliação, a presença e quantidade de conídios produzidos foi determinada pela diluição de 1g da amostra de solo

em 10 ml de água destilada esterelizada contendo Tween 80 a 0,01%. Essa solução de água e solo foi homogeneizada em vortex e diluída seriadamente ($1,0 \times 10^{-1}$ e 10^{-2} conídios mL^{-1}), para que 0,5ml da solução 10^{-2} fosse plaqueada em placas de petri contendo 8ml de meio seletivo, composto por BDA acrescido com 0,5 g/L de Ciclohexamida, 0,2 g/L de Cloranfenicol, 0,002% de princípio ativo Dodex 450SC (acetato de N- dodecil guanidínio) e 0,01 g/L de Cristal Violeta (Behie et al., 2015). Todas as placas foram seladas com plástico filme e mantidas sob condições controladas (26°C , com fotofase de 14h), durante 15 dias, visando o estabelecimento das colônias de *Metarhizium* sp. no meio de cultura. Decorrido esse período, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas em cada placa e a confirmação da espécie presente foi feita mediante observação das estruturas reprodutivas (conidióforo e conídios) em microscópio óptico com aumento de 400x e identificação taxonômica de acordo com Driver et al. (2000) e Brunner-Mendoza et al. (2018).

3.4.7 Análise dos dados

Primeiramente, foi realizado um pré-ajuste do modelo normal aos dados e foi verificada a normalidade de resíduos com o teste de Shapiro-Wilk (Shapiro e Wilk, 1965), bem como a homogeneidade de variâncias com o teste de Bartlett (Bartlett, 1937). Quando os dados não apresentarem normalidade e/ou homocedasticidade, foi utilizada uma transformação com base no método da potência ótima de Box-Cox (Box e Cox, 1964). Satisfeitas as condições, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando houver diferença significativa entre os tratamentos, múltiplas comparações (teste de Tukey, $p < 0,05$) foram realizadas para os tratamentos com níveis qualitativos, enquanto que regressões não lineares foram utilizadas para comparação dos tratamentos com níveis quantitativos. Nos casos em que a transformação dos dados não satisfaça às condições para a análise de variância, foi buscado o ajuste por meio de um modelo linear generalizado (GLM) pertencente à família exponencial de distribuições (Nelder e Wedderburn, 1962). Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software estatístico “R”, versão 2.15.1 (R Development Core Team, 2017).

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Efeito de isolados de *Metarhizium* spp. no desenvolvimento das plantas forrageiras

A presença dos isolados fúngicos ocasionaram diferenças significativas em todos os parâmetros de crescimento vegetativo avaliados, com intensidades distintas entre os três genótipos vegetais. No quesito massa fresca de folhas (tabela 2), os incrementos produtivos provenientes da presença dos isolados fúngicos foram positivos somente no Tifton 85, onde todos os isolados fúngicos proporcionaram maiores massas de folhas em relação ao controle, com exceção do isolado E9. A faixa de aumento média entre os tratamentos ficou entre 72,48% (isolado CEPAF_ENT 26) e 33,52% (CEPAF_ENT 27), quando comparada a massa média alcançada por todas as folhas das plantas não inoculadas (controle). Na espécie forrageira *H. florida*, ocorreu uma redução significativa na produção de folhas devido a presença dos isolados inoculados. Aqui, a faixa de diminuição ficou entre -7,16% e -27,41% em relação ao controle. Na *Axonopus catharinensis* (missioneira), três dos isolados reduziram a produção de massa fresca das folhas, sendo CEPAF_ENT 26 (-13,46%), CEPAF_ENT 42 (-34,37%) e CEPAF_ENT 59 (-14,59%).

Tabela 2. Massa fresca das folhas de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85, *Axonopus catharinensis* cv. SCS 315 Catarina Gigante (Missioneira) e *Hermatria altissima* cv. Florida inoculadas com os isolados de *Metarhizium* sp.

Tratamento	Massa Fresca Folhas (g)			
	Missioneira	Hermátria	Tifton 85	Médias
CEPAF_ENT 25	30,81 aA	24,93 bC	15,15 cA	23,63
CEPAF_ENT 26	22,23 bB	28,01 aC	15,23 cA	21,82
CEPAF_ENT 27	31,94 aA	21,97 bC	11,79 cA	21,9
CEPAF_ENT 42	16,86 bC	25,24 aC	13,70 bA	18,6
CEPAF_ENT 59	21,94 aB	25,73 aC	12,63 bA	20,1
E9	28,23 bA	36,64 aA	8,78 cB	24,55
IBCB 425	28,29 aA	29,75 aB	14,96 bA	24,33
Controle	25,69 bA	30,27 aB	8,83 cB	21,59
F	7,931			
GI	14,216			
Valor P	<0,0001			

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas colunas indicam diferenças significativas entre os isolados fúngicos ($p < 0,05$). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas linhas indicam diferenças significativas entre as espécies de forrageiras ($p < 0,05$).

Por estarem diretamente relacionadas, o número de folhas (tabela 3) seguiu a mesma tendência da massa fresca das folhas (Tabela 2), no qual os maiores incrementos foram observados na forrageira Tifton 85. Analisando a influência dos fungos nesta espécie, é possível observar que todos os isolados inoculados aumentaram a quantidade de folhas produzidas, com exceção do E9. O intervalo de aumento neste parâmetro foi de 65,3% (CEPAF_ENT 25) e 27,61% (CEPAF_ENT 59) em relação ao número de folhas médio das plantas controle. Na espécie *A. catharinensis* (missioneira), a produção de folhas também foi superior nas plantas inoculadas por alguns dos isolados, alcançando incrementos entre 47% (CEPAF_ENT 25) e 22,52% (E9). Não ocorreram diferenças significativas no número de folhas produzidas por plantas de *H. altissima* inoculadas em comparação com plantas não inoculadas.

Tabela 3. N° médio de folhas de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85, *Axonopus catharinensis* cv. SCS 315 Catarina Gigante (Missioneira) e *Hermatria altissima* cv. Florida inoculadas com os isolados de *Metarhizium* sp..

Tratamento	N° de Folhas			Médias
	Missioneira	Hermátria	Tifton 85	
CEPAF_ENT 25	37,20 bA	30,80 bA	88,60 aA	52,2
CEPAF_ENT 26	25,50 bB	29,30 bA	75,30 aB	43,36
CEPAF_ENT 27	35,50 bA	25,60 cA	75,70 aB	45,60
CEPAF_ENT 42	23,40 bB	28,20 bA	82,00 aA	44,53
CEPAF_ENT 59	26,40 bB	28,30 bA	68,40 aB	41,03
E9	31,00 bA	36,20 bA	54,60 aC	40,60
IBCB 425	34,00 bA	29,40 bA	83,80 aA	49,06
Controle	25,30 bB	32,20 bA	53,60 aC	37,03
F				9,11
GI				14,216
Valor P				<0,0001

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas colunas indicam diferenças significativas entre os isolados fúngicos ($p < 0,05$). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas linhas indicam diferenças significativas entre as espécies de forrageiras ($p < 0,05$).

Após a desidratação das folhas, o isolado CEPAF_ENT 59 deixou de diferir do grupo controle na espécie Tifton 85, juntando-se ao E9, que também não proporcionou diferenças significativas na massa seco das folhas (Tabela 4). Quanto aos outros isolados, foram verificados incrementos de 39,54% (CEPAF_ENT 27) até 95,48% (CEPAF_ENT 25) no peso seco em relação ao controle. Na espécie *H. florida*, apenas o isolado E9 diferiu dos demais tratamentos, proporcionando 23,12% mais massa seca em relação as plantas do controle.

Tabela 4. Massa seca de folhas (g) de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85, *Axonopus catharinensis* cv. SCS 315 Catarina Gigante (Missioneira) e *Hermatria altissima* cv. Florida inoculadas com os isolados de *Metarhizium* sp..

Tratamento	Massa Seca Folhas (g)			Média
	Missioneira	Hermátria	Tifton 85	
CEPAF_ENT 25	4,71aA	3,99bB	3,46bA	4,05
CEPAF_ENT 26	3,68bB	4,68aB	3,24bA	3,86
CEPAF_ENT 27	5,31aA	4,38bB	2,47cA	4,05
CEPAF_ENT 42	2,98bC	4,08aB	3,00bA	3,35
CEPAF_ENT 59	2,96bC	3,97aB	2,79bB	3,24
E9	3,9cB	5,91aA	2,03cB	3,95
IBCB 425	4,23aA	4,74aB	3,39bA	4,12
Controle	3,44bB	4,80aB	1,77cB	3,37
F		7,699		
GI		14,216		
Valor P		<0,0001		

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas colunas indicam diferenças significativas entre os isolados fúngicos ($p < 0,05$). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas linhas indicam diferenças significativas entre as espécies de forrageiras ($p < 0,05$).

Para o parâmetro de massa seca de folhas, a única espécie onde foram verificados desempenhos negativos em função dos isolados foi a *A. catharinensis* (Missioneira), que apresentou uma redução de aproximadamente 13,66% nas plantas inoculadas com o CEPAF_ENT 42 e CEPAF_ENT 59. Dentro dos valores desta espécie, os isolados IBCB 425, CEPAF_ENT 25 e CEPAF_ENT 27 proporcionaram incrementos significativos de 22,96%, 36,91% e 54,36% na massa seca das folhas, respectivamente.

A espécie *C. dactylon* cv. Tifton 85 foi a única onde foi observado um aumento significativo no número de perfilhos (Tabela 5), no qual os isolados fúngicos proporcionaram incrementos de 18,07% (CEPAF_ENT 27) até 48,19% (CEPAF_ENT 25), em relação a plantas não inoculadas. Nas espécies *A. catharinensis* (Missioneira) e *H. florida*, não foram verificadas diferenças significativas na formação de perfilhos.

Tabela 5. N° de perfilhos de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85, *Axonopus catharinensis* cv. SCS 315 Catarina Gigante (Missioneira) e *Hermatria altissima* cv. Florida inoculadas com os isolados de *Metarhizium* sp..

Tratamento	N° perfilhos			Média
	Missioneira	Hermáttria	Tifton 85	
CEPAF_ENT 25	7,00bA	4,10cA	12,30aA	7,80
CEPAF_ENT 26	5,20bA	4,30bA	10,40aA	6,63
CEPAF_ENT 27	6,30bA	3,60cA	9,80aA	5,56
CEPAF_ENT 42	4,50bA	4,00bA	10,70aA	6,40
CEPAF_ENT 59	5,30bA	4,30bA	8,40aB	6,00
E9	5,70bA	5,50bA	8,20aB	6,46
IBCB 425	6,30bA	4,80bA	11,00aA	7,36
Controle	6,00bA	4,30cA	8,30aB	6,20
F		0,106		
GI		14,216		
Valor P		0,002		

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas colunas indicam diferenças significativas entre os isolados fúngicos ($p < 0,05$). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas linhas indicam diferenças significativas entre as espécies de forrageiras ($p < 0,05$).

Plantas de *C. dactylon* cv. Tifton 85 foram significativamente mais altas que o controle quando inoculados com os todos os isolados fúngicos nativos de Santa Catarina (Tabela 6). Aqui, a faixa de aumento proporcionado pelos fungos ficou entre 18,3cm (CEPAF_ENT 27) e 31,85cm (CEPAF_ENT 25), que corresponde a 31,66% e 55,10%, respectivamente.

Tabela 6. Altura das plantas (cm) de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85, *Axonopus catharinensis* cv. SCS 315 Catarina Gigante (Missioneira) e *Hermatria altissima* cv. Florida inoculadas com os isolados de *Metarhizium* sp..

Tratamento	Altura (cm)			Média
	Missioneira	Hermátria	Tifton 85	
CEPAF_ENT 25	117,32 aA	115,31 aA	87,20 bA	106,61
CEPAF_ENT 26	76,04 cC	114,35 aA	89,65 bA	93,34
CEPAF_ENT 27	108,87 aA	114,39 aA	76,10 bA	99,78
CEPAF_ENT 42	84,74 bC	115,28 aA	77,85 bA	92,62
CEPAF_ENT 59	83,29 bC	120,47 aA	86,30 bA	96,68
E9	94,84 bB	109,47 aA	67,65 cB	90,65
IBCB 425	97,80 bB	119,05 aA	82,58 cA	99,81
Controle	84,98 bC	120,63 aA	57,80 cB	87,80
F	5,181			
GI	14,216			
Valor P	<0,0001			

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas colunas indicam diferenças significativas entre os isolados fúngicos ($p < 0,05$). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas linhas indicam diferenças significativas entre as espécies de forrageiras ($p < 0,05$).

Na espécie *A. catharinensis* (Missioneira), as maiores plantas foram verificadas nos tratamentos compostos pelos isolados CEPAF_ENT 25 e CEPAF_ENT 27. No qual alcançaram 32,34cm e 23,89cm a mais do que as plantas não inoculadas, representando plantas 38,05% e 28,11% mais altas. Ainda dentro do desempenho dos isolados na grama missioneira, os isolados comerciais IBCB425 e E9 proporcionaram plantas 15,08% e 11,60% mais altas em relação ao controle. Nenhum isolado de *Metarhizium* sp. ocasionou diferenças significativas no crescimento da espécie *H. florida*.

O comprimento das raízes de *A. catharinensis* (Missioneira) e *H. altissima* não foi influenciado pela inoculação dos conídios nas plantas (Tabela 7). Apenas o *C. dactylon* cv. Tifton 85 apresentou aumento significativo no comprimento da raiz em dois dos isolados testados. Estes foram o IBCB 425 e CEPAF_ENT 59, que proporcionaram respectivamente 12,32cm (25,66%) e 19,07 (39,72%) em relação a plantas não inoculadas.

Tabela 7. Comprimento da maior raiz (cm) das plantas de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85, *Axonopus catharinensis* cv. SCS 315 Catarina Gigante (Missioneira) e *Hermatria altissima* cv. Florida inoculadas com os isolados de *Metarhizium* sp..

Tratamento	Comprimento da maior raiz (cm)			
	Missioneira	Hermátria	Tifton 85	Média
CEPAF_ENT 25	44,26aA	36,19aA	49,52aB	43,32
CEPAF_ENT 26	39,74aA	40,93aA	46,39aB	42,35
CEPAF_ENT 27	46,51aA	36,12bA	51,04aB	44,55
CEPAF_ENT 42	37,86bA	31,87bA	49,40aB	39,71
CEPAF_ENT 59	32,60bA	28,39bA	67,07aA	42,68
E9	35,65aA	38,08aA	46,45aB	40,06
IBCB 425	39,63bA	37,35bA	60,32aA	45,76
Controle	33,79aA	40,62aA	48,00aB	40,80
F		2,7241		
GI		14,216		
Valor P		0,001		

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas colunas indicam diferenças significativas entre os isolados fúngicos ($p < 0,05$). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas linhas indicam diferenças significativas entre as espécies de forrageiras ($p < 0,05$).

Nenhum dos isolados fúngicos proporcionaram diferenças significativas na massa fresca das raízes de *C. dactylon* cv. Tifton 85 aos 30 dias após as inoculações (Tabela 8). A formação de raízes de *H. altissima* cv. Florida foi prejudicada devido a presença dos isolados fúngicos, visto que todos as plantas inoculadas tiveram uma redução significativa no peso fresco das raízes em relação a plantas não inoculadas. A faixa de decréscimo ficou entre 24,05% e 40,83%, que representa 1,72g - 2,92g a menos que as plantas controle, respectivamente. Somente a espécie *A. catharinensis* (Missioneira) obteve benefícios no crescimento vegetativo das raízes em função da presença dos isolados de *Metarhizium* sp.. Nesta espécie, foi verificado um aumento de 3,81g (78,07%) nas plantas inoculadas com o CEPAF_ENT 27, 3,03g (62,09%) no tratamento CEPAF_ENT 25 e 2,71g (55,53%) no CEPAF_ENT 26.

Tabela 8. Massa fresca das raízes (g) de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85, *Axonopus catharinensis* cv. SCS 315 Catarina Gigante (Missioneira) e *Hermáttria altissima* cv. Florida inoculadas com os isolados de *Metarhizium* sp..

Tratamento	Massa fresca das raízes (g)			Média
	Missioneira	Hermáttria	Tifton 85	
CEPAF_ENT 25	7,91aA	5,12bB	1,65cA	4,89
CEPAF_ENT 26	7,59aA	4,95bB	1,41cA	4,65
CEPAF_ENT 27	8,69aA	4,23bB	1,39cA	4,77
CEPAF_ENT 42	6,66aB	4,69bB	1,10cA	4,15
CEPAF_ENT 59	5,67aB	4,56aB	1,45bA	3,89
E9	5,48aB	5,30aB	1,19bA	3,99
IBCB 425	7,57aB	5,43bB	1,47cA	4,82
Controle	4,88bB	7,15aA	1,23cA	4,42
F		2,8228		
GI		14,216		
Valor P		<0,001		

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas colunas indicam diferenças significativas entre os isolados fúngicos ($p < 0,05$). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas linhas indicam diferenças significativas entre as espécies de forrageiras ($p < 0,05$).

Na espécie *A. catharinensis* (Missioneira), os tratamentos compostos por plantas inoculadas com os isolados nativos, em conjunto com o IBCB 425, alcançaram pesos secos das raízes superior ao de plantas não inoculadas (Tabela 9). As plantas do tratamento CEPAF_ENT 59 foram as que obtiveram os maiores pesos secos, com um acréscimo de 1,24g, representando 200% a mais de massa do que as raízes do controle. Os outros isolados nativos, juntamente com o IBCB 425, proporcionaram um aumento de 0,38g (61,29%) até 114,51g (114,51%), quando comparados com o peso seco de raízes não inoculadas com os isolados fúngicos.

Tabela 9. Massa seca das raízes de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85, *Axonopus catharinensis* cv. SCS 315 Catarina Gigante (Missioneira) e *Hermatria altissima* cv. Florida inoculadas com os isolados de *Metarhizium* sp..

Tratamento	Massa Seca raízes (g)			
	Missioneira	Hermátria	Tifton 85	Média
CEPAF_ENT 25	1,23 aB	1,04 aB	1,11 aA	1,12
CEPAF_ENT 26	1,18 aB	1,06 aB	0,98 aA	1,07
CEPAF_ENT 27	1,33 aB	0,95 bB	0,95 bA	1,07
CEPAF_ENT 42	1,07 aB	1,09 aB	0,76 aA	0,97
CEPAF_ENT 59	1,86 aA	1,02 bB	1,00 bA	1,29
E9	0,70 bC	1,57 aA	0,85 bA	1,04
IBCB 425	1,00 aB	1,31 aA	1,07 aA	1,12
Controle	0,62 bC	1,33 aA	0,81 bA	0,92
F		7,1052		
GI		14,216		
Valor P		<0,0001		

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas colunas indicam diferenças significativas entre os isolados fúngicos ($p < 0,05$). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas linhas indicam diferenças significativas entre as espécies de forrageiras ($p < 0,05$).

Não ocorreram modificações significativas na massa seca de raízes das plantas de *C. dactylon* cv. Tifton 85 devido a inoculação dos isolados. Em relação a espécie *H. florida*, todos os isolados nativos de *Metarhizium* sp. ocasionaram uma redução do peso seco das plantas inoculadas. A faixa de redução para este parâmetro ficou entre -0,38g (-28,57%) do isolado CEPAF_ENT 27 até -0,24g (-18,04%) do isolado CEPAF_ENT 42, em relação ao controle.

3.5.2 Teores de pigmentos fotossintéticos das gramíneas *Axonopus catharinensis* cv. scs 315 Catarina gigante (missioneira) e *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85 sob influência dos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*.

Na espécie Missioneira, os isolados CEPAF_ENT 25, CEPAF_ENT 26 estimularam uma produção de Clorofila a 37,80% e 43,23% significativamente maior que o controle, respectivamente. Esses mesmo isolados também estimularam 29,63% e 37,70% mais clorofila b, e 38,88% e 43,10% mais carotenoides, respectivamente, quando comparado a plantas sem inoculação (tabela 11). O isolado CEPAF_ENT 59 proporcionou um aumento de 26,55% mais clorofila a, 24% mais clorofila b e 34% mais carotenoides nas plantas inoculadas com seus conídios. O restante dos isolados fúngicos não diferiram estatisticamente das plantas sem inoculação (controle).

Tabela 11. Teores de pigmentos fotossintéticos de *Axonopus catharinensis* cv. SCS 315 Catarina Gigante (Missioneira) e *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85 inoculadas com os isolados de *Metarhizium anisopliae*.

Tratamentos	Clorofila a (mg/g)		Clorofila b (mg/g)		Carotenoides (mg/g)	
	Missioneira	Tifton ^{ns}	Missioneira	Tifton ^{ns}	Missioneira	Tifton ^{ns}
CEPAF_ENT 25	2,09 ± 0,15 a	2,00 ± 0,07	0,54 ± 0,04 a	0,57 ± 0,03	0,54 ± 0,04 a	0,51 ± 0,01
CEPAF_ENT 26	2,29 ± 0,09 a	1,78 ± 0,13	0,61 ± 0,02 a	0,44 ± 0,04	0,58 ± 0,02 a	0,47 ± 0,03
CEPAF_ENT 27	1,13 ± 0,09 c	2,28 ± 0,17	0,32 ± 0,03 b	0,53 ± 0,05	0,30 ± 0,02 b	0,59 ± 0,03
CEPAF_ENT 42	1,06 ± 0,10 c	2,00 ± 0,19	0,34 ± 0,03 b	0,47 ± 0,05	0,27 ± 0,03 b	0,52 ± 0,04
CEPAF_ENT 59	1,77 ± 0,11 b	2,08 ± 0,08	0,50 ± 0,03 a	0,52 ± 0,02	0,50 ± 0,03 a	0,54 ± 0,02
E9	1,00 ± 0,08 c	2,08 ± 0,14	0,34 ± 0,04 b	0,50 ± 0,03	0,25 ± 0,02 b	0,56 ± 0,04
IBCB 425	1,11 ± 0,11 c	2,05 ± 0,07	0,43 ± 0,03 b	0,49 ± 0,02	0,25 ± 0,03b	0,54 ± 0,02
Controle	1,30 ± 0,08 c	2,01 ± 0,10	0,38 ± 0,02 b	0,46 ± 0,03	0,33 ± 0,02 b	0,53 ± 0,02
F	13,322	1,3753	6,0928	1,4228	24,7847	1,5756
gl	7,144	7,144	7,144	7,144	7,144	7,144
valor de p	<0,0001	0,2201	<0,0001	0,2004	<0,0001	0,1471

1Médias seguidas de diferentes letras minúscula nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Shapiro-wilk, (p < 0.05).

^{ns} Não significativo (GLM com a distribuição Gaussian, p>0,05).

Não foram verificadas diferenças significativas nos teores de pigmentos fotossintéticos em função da presença dos isolados fúngicos inoculados em plantas de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85 (tabela 11).

3.5.3 Colonização endofítica e recuperação dos isolados selecionados a partir do substrato

A presença endofítica dos fungos inoculados foi verificada em todos os órgãos vegetais avaliados, nas duas espécies forrageiras. Entretanto, verificou-se frequências distintas na recuperação do fungo entre os intervalos de avaliação e isolados de *M. anisopliae* utilizados para a inoculação das plantas.

Na espécie *Axonopus catharinensis*, as maiores taxas de colonização endofítica dos tecidos foram verificadas aos 10 dias após as inoculações (Tabela 12), principalmente nas raízes, onde o fungo foi recuperado de 41% dos fragmentos plaqueados. No Colmo, a taxa média de recuperação no mesmo período foi de 38%, seguido pelas folhas, onde o fungo foi recuperado em 24% dos fragmentos. Após 20 dias das inoculações, foram verificadas reduções na presença endofítica dos isolados, nos quais foram recuperados em 27% das raízes plaqueadas, 26% dos colmos e 16% das folhas, atingindo os menores valores aos 40 dias, com uma taxa de colonização de 19% nas raízes, 12% nos colmos e 6% nas folhas (Tabela 12).

Tabela 12. Frequências de ocorrência (%) de isolados selecionados de *Metarhizium anisopliae* em amostras de raiz, colmo e folha de *Axonopus catharinensis* cv. SC315 Catarina gigante (Missioneira) e número de unidades formadoras de colônia (UFCs) no substrato dos vasos após 10, 20 e 40 dias da inoculação nas raízes das mudas.

Isolados	10 dias				20 dias				40 dias			
	Raiz (%)	Colmo (%)	Folha (%)	UFC (1x10 ⁻²)	Raiz (%)	Colmo (%)	Folha (%)	UFC (1x10 ⁻²)	Raiz (%)	Colmo (%)	Folha (%)	UFC (1x10 ⁻²)
CEPAF_ENT 25	32,50	22,50	25,00	325,75	15,00	35,00	22,50	223,5	22,50	12,50	10,00	154,5
CEPAF_ENT 26	50,00	57,50	30,00	270,5	42,50	35,00	20,00	287	25,00	15,00	5,00	208
CEPAF_ENT 27	45,00	45,00	27,50	190	27,50	20,00	12,50	177	17,50	17,50	10,00	147,75
CEPAF_ENT 42	30,00	40,00	20,00	99,5	27,50	30,00	15,00	115,25	22,50	12,50	7,50	87,5
CEPAF_ENT 59	60,00	50,00	32,50	100,5	42,50	35,00	25,00	153,75	27,50	20,00	2,50	148,25
E9	27,50	17,50	12,50	72,25	17,50	10,00	7,50	91,75	7,50	2,50	5,00	69,75
IBCB425	45,00	35,00	20,00	88	15,00	17,50	7,50	10,25	7,50	5,00	0,00	20,75
Controle	0,00	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0,00	0

Quanto a taxa de colonização endofítica de *A. catharinensis*, verificada dentro de cada isolado aos 10 dias após a inoculação, destaca-se o CEPAF_ENT 59, no qual foi recuperado em 47,50% dos tecidos vegetais plaqueados, seguido pelo CEPAF_ENT 26 (45,83%), CEPAF_ENT 27 (39,17%), IBCB 425 (33,33%), CEPAF_ENT 42 (30%), CEPAF_ENT 25 (26,67%) e, por último, o isolado comercial E9 (19,17%). Os isolados CEPAF_ENT 59 e CEPAF_ENT 26 continuaram com as melhores taxas de colonização até o final do período avaliado, onde 34,17% e 32,50% dos fragmentos plaqueados possuíam o *M. anisopliae* endofítico aos 20 dias e 16,67% e 15% aos 40 dias, respectivamente.

De maneira geral, considerando todos os períodos de avaliação e órgãos vegetais, o isolado que esteve presente na maior quantidade de fragmentos plaqueados foi o CEPAF_ENT 26 (32,50%), seguido pelo CEPAF_ENT 42 (29,72%), CEPAF_ENT 59 e 25 (Ambos com 29,44%), CEPAF_ENT 27 (25%), IBCB 425 (18,33%) e por fim, o isolado comercial E9, com 9,17% dos fragmentos apresentando sinais de colonização endofítica.

As contagens do número de UFC's nas placas inoculadas com soluções do substrato (1×10^{-2}) de plantas expostas aos isolados fúngicos demonstraram uma redução cronológica da quantidade de conídios viáveis. Após 10 dias da imersão das raízes na suspensão fúngica, a quantidade média de UFC entre os isolados foi de 327,38/ml (suspensão 1×10^{-2}). Após 20 dias, houve uma redução de 7,68% na quantidade de conídios no substrato, alcançando a menor quantidade aos 40 dias, onde foram verificados em média 239 conídios ml^{-1} na suspensão de solo, representando uma redução de 27% com a quantidade de UFC observada aos 10 dias após a inoculação (Tabela 13). Quanto a quantidade de conídios de cada isolado verificada na suspensão de substrato (1×10^{-2}), o que apresentou a maior quantidade média entre os períodos avaliados foi o CEPAF_ENT 26, com 382,75 conídios ml^{-1} , seguido pelo CEPAF_ENT 25 (351,87 conídios ml^{-1}), CEPAF_ENT 27 (257,37 conídios ml^{-1}), CEPAF_ENT 59 (201,25 conídios ml^{-1}), CEPAF_ENT 42 (151,12 conídios ml^{-1}), E9 (116,87 conídios ml^{-1}), e IBCB 425 (59,5 conídios ml^{-1}).

Assim como na missioneira, a maior quantidade de fragmentos vegetais de *Cynodon dactylon* com indícios de colonização endofítica foram verificados aos 10 dias após a inoculação (Tabela 13), onde os colmos apresentaram as maiores taxas médias (54,43%), seguido pela raiz (31%) e, em menor quantidade, pelas folhas (26,07%). A

mesma tendência foi verificada no intervalo de 20 dias após a exposição da planta aos conídios dos isolados, onde a taxa de colonização média dos fragmentos do colmo foram de 33,93%, das raízes (29,64%) e das folhas (9,64%). Aos 40 dias após as inoculações, verificou-se as menores taxas de colonização endofítica, que ficaram entre 4,31% (raízes), 3,57% (colmos) e 1,43% (folhas).

Tabela 13. Frequências de ocorrência (%) de isolados pré-selecionados de *Metarhizium anisopliae* em amostras de raiz, colmo e folha de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85. e número de unidades formadoras de colônia (UFC) no substrato dos vasos após 10, 20 e 40 dias da inoculação nas raízes das mudas.

Isolados	10 dias				20 dias				40 dias			
	Raiz (%)	Colmo (%)	Folha (%)	UFC (1x10 ⁻²)	Raiz (%)	Colmo (%)	Folha (%)	UFC (1x10 ⁻²)	Raiz (%)	Colmo (%)	Folha (%)	UFC (1x10 ⁻²)
CEPAF_ENT 25	35,00	67,50	32,50	140,25	25,00	10,00	5,00	136,75	0,00	0,00	0,00	128,5
CEPAF_ENT 26	35,00	87,50	45,00	167	25,00	45,00	2,50	122,25	20,00	20,00	10,00	61,25
CEPAF_ENT 27	22,50	67,50	20,00	61	35,00	40,00	15,00	35	7,50	5,00	0,00	58,5
CEPAF_ENT 42	27,50	37,50	15,00	97,75	2,50	15,00	2,50	81	22,50	12,50	0,00	24,25
CEPAF_ENT 59	37,50	67,50	35,00	171,75	77,50	87,50	27,50	182	12,50	10,00	2,50	118,5
E9	2,50	37,50	10,00	60,5	30,00	27,50	7,50	62,75	15,00	5,00	0,00	13
IBCB425	23	15,00	10,00	32,75	12,50	12,50	7,50	10,5	15,00	5,00	0,00	60,75
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0

Em relação a presença endofítica de cada isolado nos períodos pós-inoculação, aos 10 dias, os isolados que mais se destacaram foram: CEPAF_ENT 26 que estava presente em 55,83% dos fragmentos plaqueados, seguido pelo CEPAF_ENT 59 (46,67%), CEPAF_ENT 25 (45%), CEPAF_ENT 27 (36,67%). Aos 20 dias, as maiores taxas de recuperação foram verificadas no CEPAF_ENT 59 (64,17%) e CEPAF_ENT 27 (30%), todos os outros isolados alcançaram menos de 25% de fragmentos com presença dos fungos inoculados. Após 40 dias da inoculação, o único isolado presente em mais de 5% das amostras plaqueadas foi o CEPAF_ENT 25 (16,67%), todos os outros não passaram de 5% de fragmentos com indícios de colonização endofítica.

A contagem da UFC na suspensão feita com o substrato das plantas de *C. dactylon* inoculadas revelou uma redução gradativa da quantidade de conídios presentes entre os períodos avaliados (Tabela 13). Os isolados de *M. anisopliae* que apresentaram as maiores quantidades médias de conídios nas três avaliações realizadas foram o CEPAF_ENT 59, para o qual verificou-se 314,4 conídios ml⁻¹, o CEPAF_ENT 25 (270,34

conídios ml⁻¹) e CEPAF_ENT 26 (233,66 conídios ml⁻¹). Os demais isolados ficaram entre 134 conídios ml⁻¹ (CEPAF_ENT 42) e 69,34 conídios ml⁻¹ (IBCB 425).

Todos os tratamentos e intervalos de avaliação resultaram na recuperação de fungos com morfologia idêntica ao que foi inoculado, entretanto, eventualmente, outros fungos não identificados também eram encontrados nos meios seletivos utilizados para plaquear os fragmentos vegetais esterilizados na superfície.

3.6 DISCUSSÃO

Esforços multi-institucionais ao redor do mundo têm demonstrado benefícios significativos da inoculação de fungos entomopatogênicos em culturas agrícolas, verificando melhorias no crescimento vegetal de diversas espécies (Garcia et al., 2011; Sasan e Bidocka, 2012; Lopez e Sword, 2015; Ahmad et al., 2020). Nesse estudo, o primeiro que avalia os efeitos da inoculação de mudas de gramíneas forrageiras com isolados de *Metarhizium anisopliae*, verificamos significativas influências no desenvolvimento de plantas inoculadas, com resultados contrastantes entre os isolados e espécies avaliadas.

Na primeira parte, o objetivo foi verificar se existiam diferenças entre os efeitos promotores de crescimento dos isolados e sua compatibilidade com as espécies de gramíneas forrageiras *Cynodon dactylon*, *Axonopus catharinensis* e *Hermatrya florida*. Os resultados evidenciam variações entre os parâmetros de crescimento vegetativo avaliados, onde algumas espécies demonstraram melhor compatibilidade com os fungos que outras. Isso fica claro ao observarmos os parâmetros de crescimento de plantas da espécie *A. catharinensis*, inoculadas com os isolados de *M. anisopliae*, que produziram significativamente mais massa seca e fresca de folhas e raízes, maior número de folhas e atingiram maiores alturas. Entretanto, esse efeito positivo da inoculação dos fungos não foi verificado para *H. florida*, que não se mostrou compatível com os isolados na maioria dos parâmetros avaliados. Inclusive, as plantas dessa espécie tiveram uma redução em alguns parâmetros de desenvolvimento, em função da inoculação dos conídios em suas raízes. Tais resultados sugerem que a relação do *M. anisopliae* com gramíneas forrageiras é espécie-específica e pode variar de antagonismo a mutualismo, dependendo da compatibilidade entre a planta e o fungo e as características do ambiente (Tall e Mayling, 2018; Bemisile et al., 2018).

Embora a maioria dos estudos envolvendo a relação fungos entomopatogênicos - plantas obtenha resultados positivos ou neutros (Revisados por Jaber e Ownley, 2018), outros autores também verificam um decréscimo na produtividade de plantas inoculadas com estes microrganismos. Em 2021, na Espanha, Gonzales-Guzman e colaboradores verificaram uma redução significativa no número de folhas e na matéria seca de raízes de plantas de trigo inoculadas com *Metarhizium brunneum* (Metsc.) Sorokin (*Hypocreales: Clavicipitaceae*). Tall e Mayling (2018) observaram que a inoculação de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) (Ascomycota: Hypocreales) via tratamento de sementes reduziram o desenvolvimento de plantas de milho, sendo essa redução no crescimento atribuído a competição entre os isolados fúngicos inoculados e as plântulas, indicando que o fungo também pode funcionar como um competidor por nutrientes em algumas situações, reduzindo o crescimento vegetal.

Tais informações demonstram que a relação entre plantas e fungos pode limitar o crescimento de um dos envolvidos em algumas situações, tornando-se prejudicial. Por mais que esse desbalanço possa ocorrer temporariamente, esses custos cumulativos podem não ser superados até o final do ciclo da cultura, o que explicaria os resultados verificados na espécie *H. altissima* (Sanches-Rodrigues et al. 2018; Gonzales-Guzman et al. 2021). Dessa forma, trabalhos como este, que realizam uma seleção de novos isolados e avaliam sua interação com plantas de interesse agrícola são uma etapa primordial para a elaboração de novos produtos fitossanitários a base de fungos entomopatogênicos (Jaber e Ownley, 2018; Canassa et al., 2019).

Além de diferenças na tolerância a presença do fungo entre as gramíneas forrageiras, também foi possível observar uma maior compatibilidade de isolados específicos com determinadas espécies de plantas. De maneira geral, os isolados CEPAF_ENT 27 e CEPAF_ENT 25 proporcionaram resultados ruins nos parâmetros de crescimento de *H. altissima* inoculadas, entretanto, promoveram o crescimento da espécie *A. catharinensis* e do *C. dactylon*. Por outro lado, o isolado comercial IBCB 425 alcançou resultados medianos em todas as espécies testadas, demonstrando uma adaptabilidade a diferentes genótipos vegetais. Tais resultados enfatizam a ampla variação e complexidade da relação planta-fungo, de maneira semelhante a imensa variabilidade existente na virulência de cepas de *M. anisopliae* contra hospedeiros artópodes (Canassa et al. 2019). Esses isolados promissores devem, portanto, serem candidatos a participar de novas pesquisas com o objetivo de verificar sua dupla aptidão como inoculantes e efetividade

contra insetos-praga que atacam gramíneas forrageiras em condições de campo, como cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae) e lagartas desfolhadoras (Lepidóptera: Noctuidae).

Pesquisas aprofundadas são necessárias para elucidar a interação entre plantas e fungos entomopatogênicos. Talvez com a maior compreensão dessa relação, poderíamos selecionar melhor determinadas espécies de fungos para serem utilizados em culturas agrícolas de interesse. Neste sentido, muitos estudos já apontam diretrizes que modulam essa relação interespecífica. Demonstrando que as causas do efeito bioestimulante proporcionado pelos fungos é proveniente de ações diretas, como uma maior produção de fitohormônios e compostos fotossintéticos, e indiretas, como a ação antagonista a artópodes-pragas e fitopatógenos (Garrido-Jurado et al., 2016; Jaber, 2018; Jaber e Alanambeh, 2018).

Neste estudo, verificamos que a presença dos isolados CEPAF_ENT 25 e CEPAF_ENT 26 aumentaram significativamente a produção de Clorofila a, b e carotenóides das plantas de *A. catharinensis* inoculadas em relação ao controle. Gonzales-Peres e colaboradores (2022) verificaram aumentos significativos no teor de clorofilas totais 7 dias após a inoculação de isolados de *M. anisopliae* em plantas de *Arabidopsis* (Gonzales-Peres et al. 2022). Plantas inoculadas com *M. brunneum* foram capazes de aumentar sua eficiência fotossintética após a herbivoria (Moustaka et al. 2022). Em adição, já foi verificado que a colonização micorrízica de plantas estimula a produção de carbono através de melhorias na fotossíntese, mas que esse carbono adicional não resulta necessariamente em ganhos de biomassa para as plantas, mas sim no maior desenvolvimento dos microorganismos associados ao sistema radicular (Wright et al. 1998; Cloete et al. 2010). Sendo assim, é razoável deduzir que o incremento nos compostos fotosintéticos verificados na espécie *A. catharinensis* nesse estudo, são estimulados pela ação dos isolados fúngicos inoculados, com o objetivo de atender suas próprias necessidades de carbono.

Os isolados de *M. anisopliae* foram recuperados de todas as partes das plantas inoculadas, com maior ênfase nas raízes, local onde ocorreu o contato inicial entre as plantas e fungos. Diversos estudos demonstram que espécies do gênero *Metarhizium* são geralmente associados a colonização do sistema radicular (Behie et al., 2015; Greenfield et al., 2016; Russo et al., 2019). Por mais que essa informação também tenha sido verificada neste estudo, o isolamento dos fungos era comum em frações do caule e das

folhas das plantas inoculadas, principalmente aos 10 dias após a inoculação. Notamos que a taxa de colonização endofítica reduziu consideravelmente ao longo do tempo, corroborando com o verificado por outros autores, em diversas culturas agrícolas expostas a fungos entomopatogênicos (Gurulingappa et al., 2010; Parsa et al., 2013; Ahmad et al., 2020). Jaber e Ownley (2018) sugerem que a persistência da colonização endofítica possa ser estendida por meio da aplicação periódica do agente microbiano, através de diferentes métodos de inoculação como pulverizações foliares e tratamento de solo (Soil drench).

Nesse estudo, o método de inoculação testado foi a imersão de raízes em suspensão contendo conídios. Tal metodologia se mostrou eficaz para o estabelecimento endofítico dos isolados, proporcionando inclusive, seu estabelecimento no substrato utilizado no plantio das gramíneas forrageiras, com uma persistência de até 40 dias. Assim como ocorreu endofiticamente, a concentração de UFC's viáveis no substrato também foi sendo reduzida cronologicamente. As propriedades do solo e ação antagônica de outros microorganismos podem influenciar a prevalência do *M. anisopliae* (St. Leger, 2008, Garrido-Jurado et al., 2011). Canassa et al. (2019), demonstrou a permanência de isolados de *Metarhizium* spp. por 6 meses no substrato de plantas de morangueiro inoculadas pelo tratamento de raízes e cultivadas em casa de vegetação.

Para concluir, os isolados nativos CEPAF_ENT 27, CEPAF_ENT 25 e o comercial IBCB 425 foram os selecionados para utilização no próximo capítulo dessa dissertação. O método de tratamento de raízes se mostrou eficaz no estabelecimento endofítico dos isolados em *M. anisopliae* em *A. catharinensis* e *C. dactylon*, que tiveram um incremento em sua biomassa devido a presença de algumas cepas do fungo. A prospecção de novos genótipos de fungos entomopatogênicos adaptados as condições edafoclimáticas de uma região e a culturas agrícolas específicas pode possibilitar o desenvolvimento de novos produtos fitossanitários formulados com conídios. Tais pesquisas podem ajudar a consolidar novas estratégias dentro de programas de manejo integrado de pragas de pastagens, onde a aplicação massal de conídios de *Metarhizium* spp. são recorrentes para controle de populações de cigarrinhas-das-pastagens.

1 **Material suplementar**

2

3 **SM - Tabela 1.** Desempenho dos isolados de *M. anisopliae* nos parâmetros de crescimento de plantas de *Axonopus catharinensis* cv. SCS 315
 4 Catarina Gigante (Missioneira), *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85 e *Hermatria florida*.

5

Massa fresca folhas			N° de folhas			Massa seca folhas			Perfilhos			Altura			Comprimento raiz			Massa fresca raiz			Massa seca raiz		
M ¹	H ²	T ³	M	H	T	M	H	T	M	H	T	M	H	T	M	H	T	M	H	T	M	H	T
27	E9	26	25	ns	25	27	E9	25	ns	ns	25	25	ns	26	ns	ns	59	27	C	ns	59	E9	ns
25	C	25	27	IBCB		25	C	IBCB	IBCB			27	25		IBCB			25	IBCB		27	C	
IBCB	IBCB	IBCB	IBCB		42	IBCB	IBCB	26	42			IBCB	59		27			26	E9		25	IBCB	
E9	26	42	E9	27		E9	26	42	26			E9	IBCB		25			IBCB	25		26	42	
C	59	59	59	26		26	27	59	27			C	42		42			42	26		42	26	
26	42	27	26	59		C	42	27	59			42	27		C			59	42		IBCB		25
59	25	C	C	E9		42	25	E9	C			59	E9		E9			E9	59		E9	59	
42	27	E9	42	C		59	27	C	E9			26	C		26			C	27		C	27	

6

7 ¹ *Axonopus catharinensis* cv. SCS 315 Catarina Gigante (Missioneira); ² *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85; ³ *Hermatria altissima* cv. florida.

8 Nota: 25 = Isolado CEPAF_ENT 25; 26 = Isolado CEPAF_ENT 26; 27 = Isolado CEPAF_ENT 27; 42 = Isolado CEPAF_ENT 42; 59 = Isolado CEPAF_ENT
 9 59; IBCB = Isolado IBCB 425; C = Controle.

10 ns: Não significativo.

3.7 REFERÊNCIAS

- Ahmad, I., Jiménez-Gasco, M.D.M., Luthe, D.S., Barbercheck, M.E., 2020. Systemic colonization by *Metarhizium robertsii* enhances cover crop growth. *J. Fungus*. 6(2): 64.
- Behie, S.W.; Jones, S.J.; Bidochka, M.J., 2015. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology*, Manchester, 13:112-119,
- Behie, S.W., Moreira, C.C., Sementchoukova, I., Barelli, L., Zelisko, P.M., Bidochka, M.J., 2017. Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. *Nat. Commun.* 8, 142-145.
- Brunner-Mendoza C., Reyes-Montes M.R., Moonjely S., Bidochka M.J., Toriello C., 2018. A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. *Biocontrol Science and Technology*, 1–20.
- Branine, M., Bazzicalupo, A., Branco, S., 2019. Biology and applications of endophytic insect-pathogenic fungi. *PLoS Pathogens*, 15(7), e1007831.
- Congio, G.F.S., Corsi, M., Almeida, P.C., Goulart, R.D.C.D., Passos, L.P., Kopp, M.M., 2012. Rebrotta do capim-marandu submetido ao ataque de cigarrinhas. *Arquivos do Instituto Biológico*, 79, 389-396.
- Canassa, Fernanda. Effects of entomopathogenic fungi used as plant inoculants on plant growth and pest control. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Congio, G.F.S., de Almeida, P.C., Barreto, T.R., Tinazo, V.A., da Silva, T.A.C.C., Costa, D.F.A., Corsi, M., 2020. Spittlebug damage on tropical grass and its impact in pasture-based beef production systems. *Scientific Reports*, 10(1), 1-12.
- Cloete, K.J., Valentine, A.J., Botha, A., 2010. Effect of the soil yeast *Cryptococcus laurentii* on the photosynthetic water and nutrient-use efficiency and respiratory carbon costs of a Mediterranean sclerophyll, *Agathosma betulina* (Berg.) Pillans. *Symbiosis*, 51(3), 245–248.
- Chiaradia L.A., Miranda M., Fedatto V.J.J., 2013. Flutuação populacional de cigarrinhas-das-pastagens na grama-missioneira-gigante. *Agro Catarinense*, 26 (1): 70-75.
- Costa H.B.A., Dantas R.M., Alvarenga M.B., Peripolli V., Tanure C.B., Mcmanus C., 2018. Programs for best dairy management practice in Brazil and their applications. *J Clean Prod* 176(1): 1026-1033.
- Driver, F., Milner, R.J., Trueman, J.W.H., 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol. Res.* 104(2), 134–150.
- EPAGRI, Síntese anual da agricultura de santa catarina 2019-2020. Florianópolis: Epagri/Cepa, 2014. <http://www.epagri.sc.gov.br/>. Accessed 03 August 2017.

Gonzalez-Guzman, A., Raya-Diaz, S., Sacristán, D., Yousef, M., Sánchez-Rodríguez, A. R., Barrón, V., ... Torrent, J., 2021. Effects of entomopathogenic fungi on durum wheat nutrition and growth in the field. *European Journal of Agronomy*, 128, 126282.

Garrido-Jurado, I., Montes-Moreno, D., Sanz-Barrionuevo, P., Quesada-Moraga, E., 2020. Delving into the Causes and Effects of Entomopathogenic Endophytic *Metarhizium brunneum* Foliar Application-Related Mortality in *Spodoptera littoralis* larvae. *Insects*. 11(7), 429.

Garrido-Jurado, I.; Resquín-Romero, G.; Amarilla, S.P.; Ríos-moreno, A.; Carrasco, L.; Quesada-Moraga, E., 2016. Transient endophytic colonization of melon plants by entomopathogenic fungi after foliar application for the control of *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: aleyrodidae). *Journal of Pest Science*, 90 (1) 319-330.

González-Pérez, E., Ortega-Amaro, M. A., Bautista, E., Delgado-Sánchez, P., & Jiménez-Bremont, J. F., 2022. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* enhances Arabidopsis, tomato, and maize plant growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 176, 34-43.

Gurulingappa, P., Sword, G.A., Murdoch, G., McGee, P.A., 2010. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. *BioControl*. 55: 34–41.

Garcia, J. E.; Posadas, J. B.; Peticari, A.; Lecuona, R.E., 2011. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. *Advanced Biological Research*, v.5, p.22–27.

Greenfield, M., Gómez Jiménez, M.I., Ortiz, V., Veja, F.E., Kramer, M., Parsa, S., 2016. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Bio. Contl.* 95, 40-48.

Honorato, L. A., Machado Filho, L. C. P., Silveira, I. B., Hötzel, M. J., 2014. Strategies used by dairy family farmers in the south of Brazil to comply with organic regulations. *Journal of dairy science*, 97(3), 1319-1327.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística., 2018. Pesquisa pecuária municipal. Available from: <http://www.ibge.gov.br/>. Accessed March 2021.

Jaber, L.R., Alananbeh, K.M., 2018. Fungal entomopathogens as endophytes reduce several species of *Fusarium* causing crown and root rot in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biological Control*, 126, 117–126.

Jaber, L.R., 2018. Seed inoculation with endophytic fungal entomopathogens promotes plant growth and reduces crown and root rot (CRR) caused by *Fusarium culmorum* in wheat. *Planta*.

Jochims, F., Silva, A.W.L.; Portes, V.M., 2017. Espécies forrageiras mais utilizadas em pastagens na Região Oeste de Santa Catarina. *Agropecuária Catarinense*, 30 (3): 15-18.

- Jaber, L.R., Enkerli, J., 2017. Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth? *Biocontrol Sci. Technol.* 27(1), 28-41.
- Lopez, D.C., Sword, G.A., 2015. 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*). *Bio. Control.* 89, 53-60.
- Lohmann, T.R.; Pietrowski, V.; Bressan, D.F., 2010. Flutuação populacional de cigarrinhas-daspastagens na região Oeste do Paraná. *Semina*, v.31, p.1291-1298.
- Moustaka, J., Meyling, N.V., Hauser, T.P., 2021. Root-Associated Entomopathogenic Fungi Modulate Their Host Plant's Photosystem II Photochemistry and Response to Herbivorous Insects. *Molecules*, 27(1), 207.
- Parsa, S., Ortiz, V., Vega, F.E., 2013. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. *JoVE.* 74, 50360.
- Rembischevski, P., Caldas, E.D., 2018 Agroquímicos para controle de pragas no Brasil: análise crítica do uso do termo agrotóxico como ferramenta de comunicação de risco. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, 6(4): 2-12.
- Ribeiro, L.P., Cazarotto, A.R., 2019. Cigarrinhas-das-pastagens em Santa Catarina: avaliação do complexo de espécies e da incidência natural de fungos entomopatogênicos. *Agropecuária Catarinense*, 32(2), 73-79.
- Russo, M.L., Scorsetti, A.C., Vianna, M.F., Allegrucci, N., Ferreri, N.A., Cabello, M.N., Pelizza, S.A. Effects of endophytic *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) on biological, reproductive parameters and food preference of the soybean pest *Helicoverpa gelotopoeon*. *J. King Saud Univ.-Sci.* 2019, 31, 1077–1082.
- Ribeiro, L.P., Cazarotto, A.R. (2019). Cigarrinhas-das-pastagens em Santa Catarina: avaliação do complexo de espécies e da incidência natural de fungos entomopatogênicos. *Agropecuária Catarinense*, 32(2), 73-79.
- St. Leger, R.J., 2008. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *J. Invertebr. Pathol.* 98, 271–276.
- Sasan, R. K.; Bidochka, M. J., 2013. Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* sp.phaseoli. *Informa UK Limited. Canadian Journal Of Plant Pathology*, 35(3):288-293.
- Schultz, B., Guske, S., Dammann, U., Boyle, C., 1998. Endophyte–host interactions II. Defining symbiosis of the endophyte–host interaction. *Symbiosis*, 25, 213-227.
- Sharma, R., Sharma, P., 2021. Fungal entomopathogens: a systematic review. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 1-13.

Sasan, R.K.; Bidochka, M.J., 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *Wiley, American Journal Of Botany*, 99(1) 101-107.

Tall, S., Meyling, N.V., 2018. Probiotics for plants? Growth promotion by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* depends on nutrient availability. *Microbial ecology*, 76(4), 1002-1008.

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

Wright, D. P., Read, D. J., & Scholes, J. D., 1998. Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment*, 21(9), 881–891.

CAPÍTULO 4

Efeito antagônico de isolados endofíticos de *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Clavicipitaceae) no desenvolvimento, reprodução e seleção de hospedeiros de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

4.1 RESUMO

Conhecer as interações de fungos entomopatogênicos endofíticos com plantas forrageiras e sua influência sobre *Spodoptera frugiperda*, uma praga emergente dos sistemas pastoris, é importante para elucidar as multifuncionalidades desses microrganismos e seus benefícios aos agroecossistemas. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a influência da colonização endofítica com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* (CEPAF_ENT 25, CEPAF_ENT 27 e IBCB 425) em plantas de *Cynodon dactylon* (L.) Pers (Poaceae) cv. Tifton 85 sobre aspectos biológicos e comportamentais de *S. frugiperda*, em condições laboratoriais. A aplicação de suspensões (1×10^8 conídios ml^{-1}) dos referidos isolados na base de touceiras de *C. dactylon* foi efetivo na promoção da colonização endofítica. Lagartas de *S. frugiperda* alimentadas durante toda a fase larval com folhas de plantas colonizadas endofiticamente pelos três isolados estudados apresentaram prejuízos consideráveis em seu desempenho biológico, inclusive sobre parâmetros de sua tabela de vida de fertilidade. Dessa forma, aplicações de micoinseticidas à base de *M. anisopliae* visando ao manejo do complexo de cigarrinhas-das-pastagens, seu principal emprego atualmente, podem conduzir na colonização endofítica de *C. dactylon* cv. Tifton 85 e influenciar na densidade populacional de *S. frugiperda*. Assim, tais isolados apresentam múltiplos espectros de ação e potencial na geração de novos produtos biológicos a serem ofertados ao mercado.

Palavras-chave: *Cynodon dactylon*, lagarta-do-cartucho, fungos entopatogênicos, seleção hospedeira, desempenho biológico, resistência induzida.

4.2 ABSTRACT

Knowing the interactions of endophytic entomopathogenic fungi with forage plants and their influence on *Spodoptera frugiperda*, an emerging pest of pastoral systems, is important to elucidate the multifunctionality of these microorganisms and their benefits to agroecosystems. Thus, the aim of this study was to verify the influence of endophytic colonization with different isolates of *Metarhizium anisopliae* on *Cynodon dactylon* (L.) Pers (Poaceae) cv. Tifton 85 on biological and behavioral aspects of *S. frugiperda*, under laboratory conditions. The application of a suspension of the isolates (1×10^8 conidia ml⁻¹) on the base of *C. dactylon* clumps was effective in promoting endophytic colonization. *S. frugiperda* caterpillars fed throughout their larval stage with leaves of plants colonized endophytically by the 3 isolates studied (CEPAF_ENT 25, CEPAF_ENT 27 and IBCB 425) of *M. anisopliae* showed considerable losses in their biological performance, especially in parameters of their table of fertility life. Thus, applications of mycoinsecticides based on *M. anisopliae* aiming at the management of the spittlebug complex, its main use today, may lead to the endophytic colonization of *C. dactylon* cv. Tifton 85 and influence *S. frugiperda* populacional density. Thus, such isolates present multiple spectrums of action and potential in the generation of new biological products to be offered to the market.

Keywords: *Cynodon dactylon*, fall armyworm, entomopathogenic fungi, host selection, biological fitness, induced resistance.

4.3 INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma espécie-praga polífaga que ataca diversas culturas de interesse agrícola (Montezano et al. 2018) distribuída, atualmente, pela América, África, Ásia e Oceania (Fan et al. 2020; Liu et al. 2020; Eppo 2021; Tapa-Yotto et al. 2021). Entre as espécies cultivadas atacadas por *S. frugiperda* encontram-se diferentes gramíneas (Poaceae) forrageiras, tanto perenes quanto anuais, as quais são à base da alimentação dos rebanhos em sistemas extensivos e semi-intensivos praticados na pecuária brasileira (Ribeiro et al. 2020). Em pastagens, o manejo de *S. frugiperda* é majoritariamente realizado por aplicações de inseticidas sintéticos, especialmente do grupo dos carbamatos, organofosforados e piretroides (Flonc et al. 2021). No entanto, inseticidas de amplo espectro de ação eliminam insetos benéficos e apresentam riscos ecotoxicológicos (Boaventura et al. 2020). Em adição, acarretam elevada pressão de seleção sobre a praga devido ao limitado número de grupos químicos disponíveis e ao uso frequente de manejo, o que pode acelerar a seleção de populações resistentes (Yu 1991; Boaventura et al. 2020; Flonc et al. 2021). Assim, o desenvolvimento de métodos alternativos de manejo de *S. frugiperda* em sistemas pastoris é uma eminente necessidade (Mosallanejad and Smagghe 2009; Carvalho et al. 2013; De Lira et al. 2020), especialmente de estratégias que busquem restabelecer o equilíbrio biológico.

O emprego de fungos entomopatogênicos, como o ascomiceto filamentosso *Metarhizium* (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae), configura-se em uma promissora opção para o manejo integrado de insetos de diferentes ordens (Jaber and Ownley 2017; Garrido-Jurado et al. 2020; Montzoukas e Elipoulos 2020). Espécies de *Metarhizium* habitam solos (saprófitos) de regiões temperadas, subtropicais e tropicais, e têm sido amplamente utilizados para elaboração de micoinseticidas comerciais (Bischoff et al. 2009; Lovatto and Ribeiro 2017; Sullivan et al. 2022). A aplicação desses microrganismos ocorre, na maioria das vezes, pela pulverização de produtos formulados elaborados com base em seus conídios sobre o dossel das plantas, com o objetivo de inocular tais estruturas sobre as pragas-alvo e iniciar a infecção de forma percutânea (Zimmermann 2007). Um dos maiores sucessos do emprego de *Metarhizium* para o manejo de insetos-praga é justamente em pastagens, no qual a anos tem sido utilizado no manejo do complexo de cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae), principais

pragas de gramíneas forrageiras na América Latina (Lohmann et al. 2010; Chiaradia et al. 2013; Ribeiro e Cazarotto 2019).

Estudos recentes mostram que fungos entomopatogênicos são capazes de colonizar plantas endofiticamente, promovendo o crescimento vegetal e induzindo resistência contra agentes bióticos (Jaber and Owley 2018; Quesada 2020; Mantzoukas et al. 2022). Assim, essas interações benéficas entre plantas e microrganismos podem propiciar o aumento da produtividade dos cultivos e conferir uma proteção sistêmica a artrópodes-praga e fitopatógenos (para informações adicionais, consultar revisão de Jaber and Owley 2018). A ação antagonista da colonização endofítica de isolados de *Metarhizium* sobre diferentes espécies do gênero *Spodoptera* já foi verificada em distintas culturas agrícolas, incluindo tomate (Mwamburi 2021), alfafa e melão (Romero et al. 2016), milho (Ahmad et al. 2020; De Lira et al. 2021) e abóbora (Shaalán et al. 2021). Entretanto, até o momento, não há estudos disponíveis sobre os efeitos da interação entre isolados de *Metarhizium* e plantas forrageiras, tampouco sobre sua influência em aspectos biológicos e no comportamento de seleção hospedeira de *S. frugiperda*, principal espécie de lepidóptero-praga incidente em pastagens no Brasil (Ribeiro et al. 2020). Diante desse contexto, o objetivo deste estudo foi verificar a influência da colonização endofítica com diferentes isolados de *M. anisopliae* em plantas de *Cynodon dactylon* (L.) Pers (Poaceae) cv. Tifton 85 sobre aspectos biológicos e comportamentais de *S. frugiperda*, em condições laboratoriais.

4.4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.4.1 Plantas forrageiras.

Gramma-bermuda, *C. dactylon* cv. Tifton 85, foi utilizada no presente estudo em virtude da suscetibilidade a *S. frugiperda* (Ribeiro et al. 2020) e histórico recorrente de surtos populacionais no sul do Brasil (Ribeiro e Castilhos 2018). Para obtenção de mudas, estacas do colmo contendo 2 gemas (~ 10 cm) obtidas de matrizes mantidas na coleção de plantas forrageiras da Epagri/Cepaf em Chapecó, SC, Brasil (27°05'24,5" S; 52°38'09,7" O) foram utilizadas. As estacas padronizadas foram então plantadas em tubetes (15 cm) contendo substrato comercial Turfa Fértil® (Florestal S.A., Balneário Arroio do Silva, SC, Brasil), autoclavado em 3 ciclos de 120 °C durante 1 h 20 min. O enraizamento das estacas ocorreu em casa de vegetação com temperatura semi-controlada (26 ± 5 °C) e irrigação manual, realizada diariamente. Depois de ~ 45 dias, as estacas

enraizadas foram transplantadas para vasos de polipropileno autoclavados, com tamanho específico para cada teste.

4.4.2 Insetos.

Specimens de *S. frugiperda* utilizados nos estudos foram oriundos de uma população laboratorial estabelecida a partir de lagartas coletadas em área de pastagem de grama-bermuda em Chapecó, SC, Brasil (27°10'33,4" S; 52°43'6,2" O). Em laboratório, a população foi multiplicada por, pelo menos, 5 gerações antes da utilização nos bioensaios. Em laboratório, as lagartas foram mantidas individualizadas em tubos de vidro (8 cm × 2,5 cm) e alimentadas com dieta artificial proposta por Greene et al. (1976). Por sua vez, os adultos foram mantidos em gaiolas de PVC (20 cm de altura × 10 cm de diâmetro) forrados com papel germitest (substrato de oviposição; J. Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil) e alimentados com solução de mel a 10% (p p⁻¹). Durante todo o ciclo, os insetos foram mantidos em sala climatizada (25 °C, U.R.: 60 ± 10% e fotofase de 14 h).

4.4.3 Isolados de *M. anisopliae*: origem, multiplicação, preparação das suspensões e inoculação nas plantas.

Os isolados CEPAF_ENT 25 e CEPAF_ENT 27 de *M. anisopliae*, oriundos da Coleção de Fungos Entomopatogênicos da Epagri/Cepaf, foram utilizados no estudo em virtude da promissora ação biopesticida e potencial biotecnológico observado em estudos prévios (Ribeiro et al., *In prep.*), assim como da capacidade de promover o crescimento e associar-se endofiticamente com gramíneas forrageiras (capítulos 2 e 3 dessa dissertação.). Além dos dois isolados nativos, também foi utilizado o isolado IBCB425 em virtude de seu amplo emprego na formulação de micoinseticidas disponíveis no mercado brasileiro.

Para multiplicação dos isolados, utilizou-se o método de fermentação sólida em arroz autoclavado, conforme proposto por Prakash et al. (2008), com modificações. Para isso, conídios dos 3 isolados de *M. anisopliae* foram retirados de tubos criogênicos com glicerol 10%, mantidos no ultrafreezer (-80 °C) e inoculados, separadamente, em placas de Petri contendo 10 ml de meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) Difco[®] (Becton-Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, USA). Após ~ 10 dias, os conídios foram obtidos pela raspagem da superfície do meio de cultura com uma espátula esterilizada e subsequente

imersão em água destilada contendo Tween[®] 80 0,01% (v v⁻¹). Feito isso, 2 ml das suspensões foram inoculadas com pipetas estéreis em tubos Schott[®] (Schott Brasil Ltda., Itupeva, SP, Brasil) de 250 ml, contendo 50 g de arroz parboilizado autoclavado (120 °C, 25 min). Após a inoculação, os tubos foram incubados a 26 °C e fotofase de 12 h.

Depois da completa colonização do substrato (~ 10 dias), foi feita a filtração e separação dos conídios. Para tanto, adicionou-se 150 ml de água destilada esterilizada contendo 0,01 ml de Tween[®] 80 em cada tubo Schott[®], que foram agitados em uma mesa agitadora por 30 min. Após esse período e dentro de uma câmara de fluxo laminar, os conídios foram obtidos por meio da filtração da suspensão com tecido fino do tipo voile, previamente esterilizado, e depositados em erlenmeyer estéril. As soluções obtidas foram agitadas em um vórtex e diluídas de forma seriada, com o objetivo de estimar as quantidades de conídios na suspensão com o auxílio de um hemocítmetro e de um microscópio óptico com aumento de 400 × Axio Scope A1 (Carl Zeiss do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). A concentração final foi ajustada pela adição de água destilada esterilizada contendo 0,01 ml de Tween[®] 80, até que se obtivesse suspensões com 1×10^8 conídios ml⁻¹ para utilização nos bioensaios.

A suspensão de conídios dos isolados de *M. anisopliae* foi inoculada em plantas de *C. dactylon* cv. Tifton 85 (~ 20 cm de altura) 15 dias antes dos respectivos testes, e ocorreu pela deposição direta da suspensão no substrato na base das plantas. A quantidade de suspensão inoculada variou entre os diferentes testes, visto que foram utilizados vasos com diferentes volumes, de acordo com o objetivo de cada bioensaio. Vasos com capacidade de 1050 ml (testes sobre parâmetros biológicos) receberam 8 ml de suspensão, diretamente na base das plantas com uma pipeta graduada com ponteiros estéreis. Já os vasos com capacidade de 415 ml (testes comportamentais), receberam 3 ml de suspensão de conídios. As plantas do tratamento controle receberam água destilada esterilizada contendo 0,01 ml de Tween[®] 80, no mesmo volume em que foram utilizados os tratamentos.

4.4.4 Bioensaios

4.4.4.1 Efeito da alimentação com plantas colonizadas endofiticamente com isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda*

Folhas da porção apical de plantas de *C. dactylon* foram coletadas 15 dias após as inoculações com os distintos isolados de *M. anisopliae*, desinfetadas superficialmente pela imersão em hipoclorito de sódio 1% ($v v^{-1}$) por 2 min e tríplice lavagem em água destilada estéril. Posteriormente, 5 pedaços de folhas (3×1 cm) e uma tira de papel cartão umedecido com água destilada, foram colocados em tubos de vidro ($8,5 \times 2,5$ cm), sendo, posteriormente, introduzida uma lagarta neonata de *S. frugiperda* com até 24 h de idade oriunda da criação de manutenção. Como controle negativo, foram fornecidas folhas de *C. dactylon* de plantas não inoculadas com *M. anisopliae*. Após a infestação, os tubos foram fechados na parte superior com algodão hidrófilo estéril e mantidos em condições controladas (25 ± 2 °C, U.R. $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h) até atingirem a fase de pupa (Figura 1).

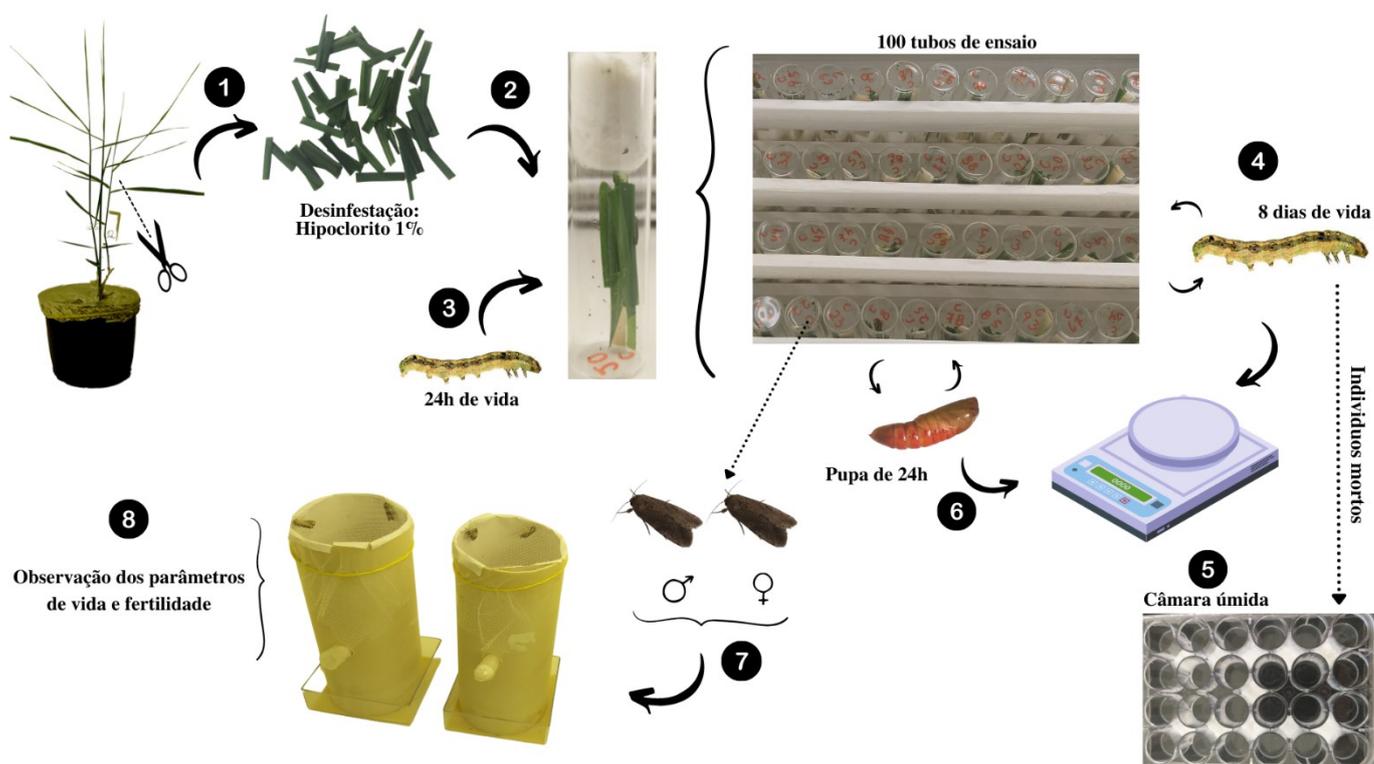


Figura 1. Esquema ilustrativo do procedimento de bioensaio utilizado na avaliação da influência da inoculação de plantas de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85 com isolados de *Metarhizium anisopliae* em parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda*.

Os pedaços de folhas de *C. dactylon* foram substituídos a cada 12h e, quando necessário, também o papel cartão umedecido. Os parâmetros biológicos avaliados foram

duração (dias) e viabilidade (%) da fase larval, pupal e do ciclo biológico (ovo a adulto), o peso larval (mg) no oitavo dia após a inoculação, a duração (dias) das fases larval e pupal, o peso de pupa (mg) com 24 h de idade e a razão sexual (rs). O bioensaio foi conduzido sob delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento. Cada repetição foi formada por 10 tubos de vidro contendo uma lagarta individualizada ($n = 100$).

Durante a fase adulta foram avaliados os períodos (dias) de pré-oviposição e oviposição, assim como, a fecundidade total (número de ovos). Esses parâmetros biológicos foram avaliados a partir da formação de 20 casais de *S. frugiperda* por tratamento, individualizados em gaiolas de PVC (23 cm altura \times 10 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel germitest como substrato de oviposição. Diariamente, contabilizou-se o número de ovos e registrou-se a mortalidade dos adultos. Como alimento aos adultos foi fornecido, diariamente, uma solução de mel a 10% ($p\ p^{-1}$). Para determinação do período embrionário e viabilidade foram coletados os ovos da segunda postura de cada casal, os quais foram acondicionados em placa de Petri (12 cm de diâmetro \times 1,5 cm de altura) com um disco de papel filtro umedecido com água destilada, sendo fechados na parte lateral com filme plástico.

4.4.4.2. Efeito no consumo foliar de *Spodoptera frugiperda*.

Teste com chance de escolha: As plantas utilizadas para obtenção das folhas foram inoculadas 15 dias antes do início do bioensaio e tiveram a colonização endofítica de *M. anisopliae* confirmada em todos os seus tecidos (folhas, colmos e raízes – Tópico 4.4.4.4). Para contenção das lagartas, utilizaram-se arenas confeccionadas com placas de Petri ($\varnothing = 140$ mm), forradas com papel germitest estéril (1 h em estufa a 250 °C) e umedecido com 4 ml de água destilada esterilizada. Em cada arena foi adicionado 1 fragmento foliar de 2,5 cm² (mensurado com medidor de área foliar) de cada um dos 4 tratamentos (3 isolados de *M. anisopliae* + controle) nas bordas das placas de maneira eqüidistantes. Após isso, uma lagarta de 3^o instar foi acondicionada no centro de cada arena (Figura 2).

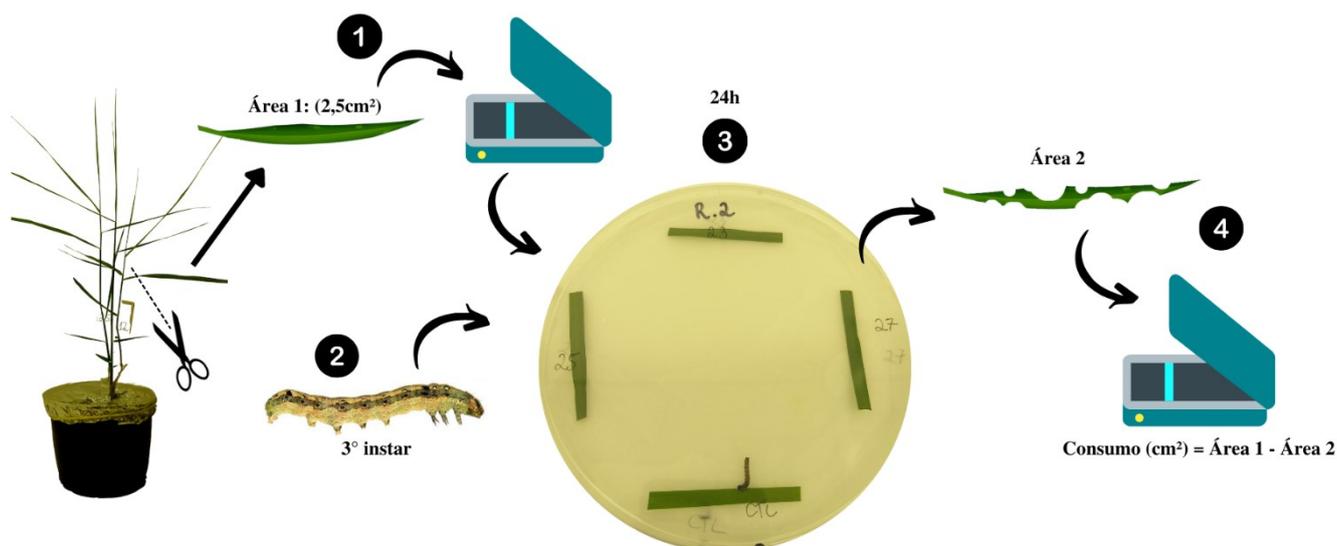


Figura 2. Esquema ilustrativo do procedimento de bioensaio utilizado na avaliação do consumo foliar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em fragmentos de folhas oriundos de plantas *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85 inoculadas com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*, em teste com chance de escolha.

Para cada tratamento, foram utilizadas 35 repetições (arenas), dispostas em delineamento inteiramente aleatorizado e mantidas sob condições controladas (25 °C, U.R.: $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h). Após 24 h de alimentação, foi realizada a mensuração (cm^2) do consumo foliar com auxílio do medidor de área foliar modelo LI-3100C (Licor Inc., Lincoln, NE, USA), conforme método empregado por Eborá et al. (1994). Para dimensionar o consumo, a área consumida pelas lagartas foi subtraída da área inicial dos fragmentos fornecidos.

Teste sem chance de escolha: As mesmas arenas, condições experimentais, número de repetições e delineamento do ensaio anterior foram utilizados no teste sem chance de escolha, exceto a utilização de um único fragmento de folha ($2,5 \text{ cm}^2$) de cada tratamento disposto no centro de cada placa (Figura 3).

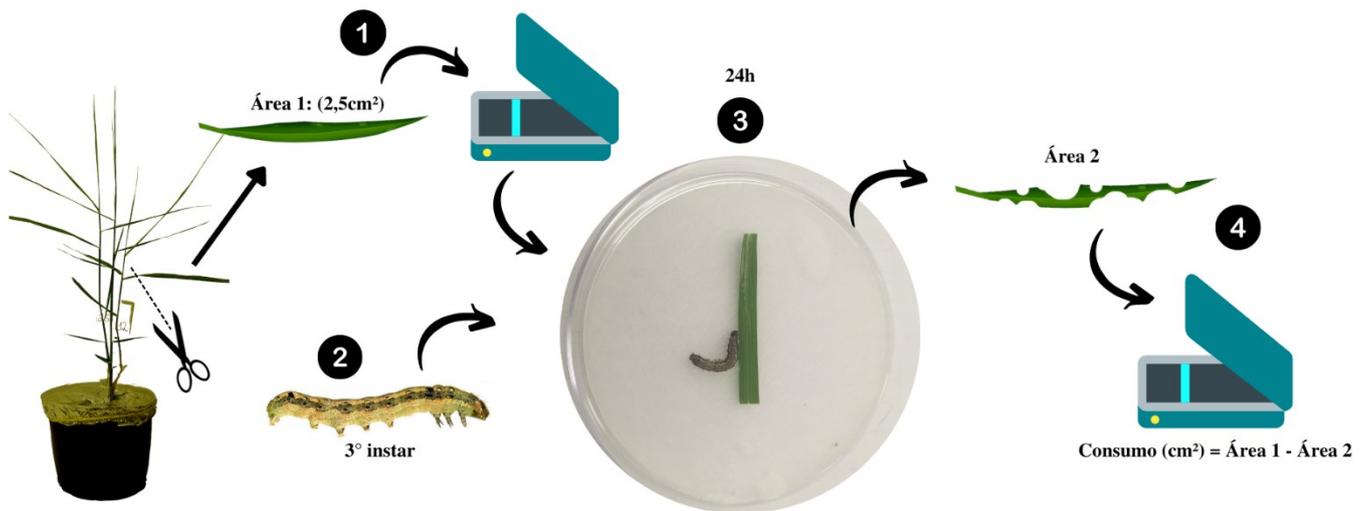


Figura 3. Esquema ilustrativo do procedimento de bioensaio utilizado na avaliação do consumo foliar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em fragmentos de folhas oriundos de plantas de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85 inoculadas com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*, em teste sem chance de escolha.

4.4.4.3. Efeito na preferência de oviposição de *Spodoptera frugiperda*

O teste de preferência de oviposição foi realizado em sala climatizada (25 °C, U.R.: 60 ± 10% e fotofase de 14 h), onde 10 gaiolas teladas circulares (50 cm de altura × 27 cm de diâmetro) foram dispostas aleatoriamente. Em cada gaiola, foram acondicionadas 4 plantas de *C. dactylon* (uma de cada tratamento), cultivadas em vasos plásticos (0,475l) com 415 ml de substrato (Figura 4). Posteriormente, as plantas foram inoculadas com suspensão (1×10^8 conídios mL⁻¹) dos 3 isolados de *M. anisopliae* (CEPAF_ENT 25, CEPAF_ENT 27 e IBCB425) com auxílio de uma pipeta com ponteiros estéreis. Como controle negativo foram utilizadas plantas de *C. dactylon* sem a presença de *M. anisopliae*.

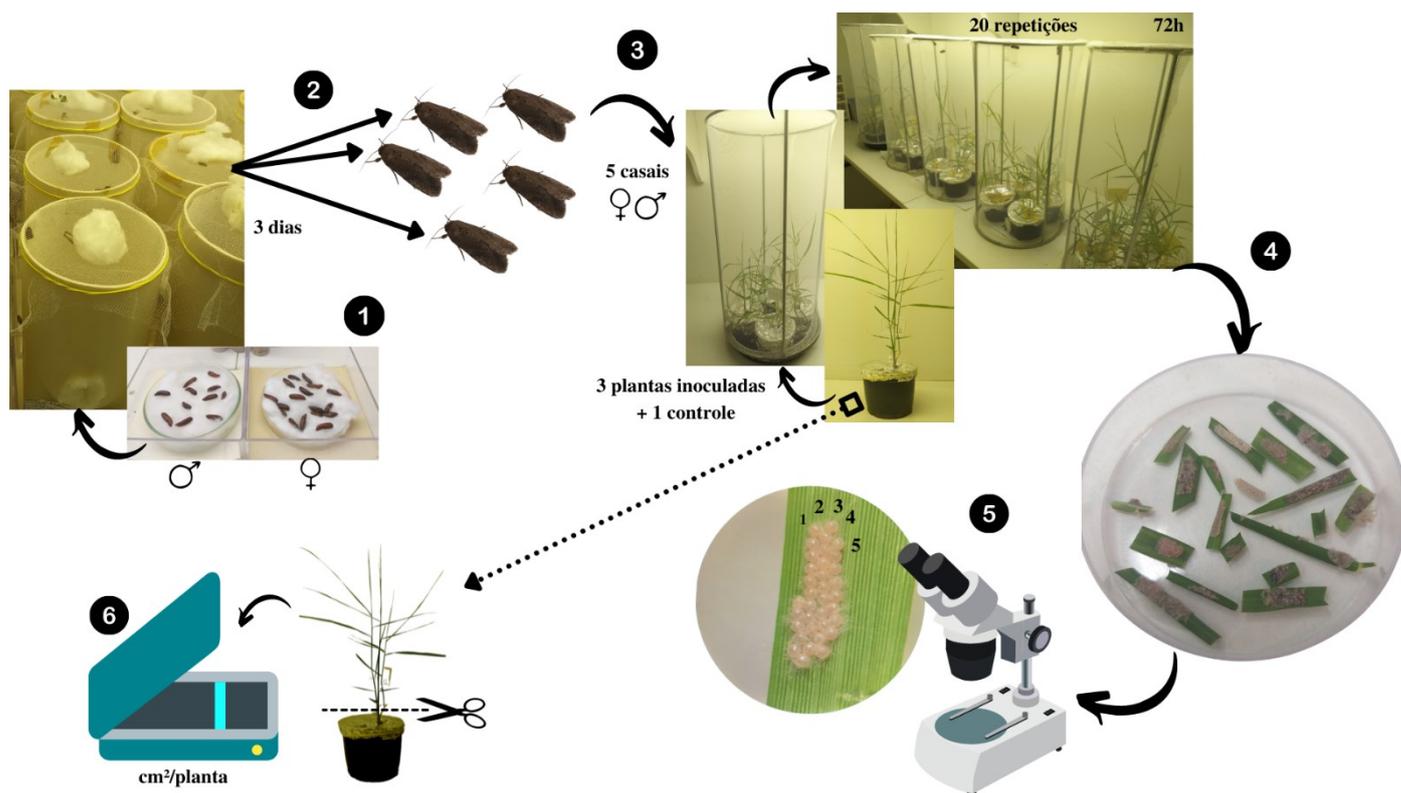


Figura 4. Esquema ilustrativo do procedimento de bioensaio utilizado na avaliação da preferência de oviposição de *Spodoptera frugiperda* em plantas de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85 inoculadas com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*, em teste com chance de escolha.

Decorrido 15 Dias Após a Inoculação, foi avaliado a presença endofítica dos fungos inoculados mediante a confirmação em todos os tecidos vegetais (folhas, colmos e raízes). Após a confirmação, no centro de cada gaiola (repetição), foram liberados 5 casais de *S. frugiperda* com 3 dias de idade [após período de pré-oviposição (Cruz 1995)], oriundos da população de manutenção. A vistoria e identificação das plantas com posturas foi realizada 72 h após a infestação com os adultos. Para tanto, os tecidos vegetais que continham as massas de ovos foram retirados, excisados, alocados em placas de Petri. Posteriormente, com auxílio de uma estereoscópio (Bel Equipamentos Analíticos Ltda., Piracicaba, SP, Brasil) foi realizado a contagem dos ovos. Após a contagem dos ovos presentes em cada planta, a área foliar foi avaliada por meio de um medidor de área foliar LI-3100C, visando a definição do número de ovos por cm^2 . O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, como 20 repetições (gaiolas) por tratamento.

4.4.4.4 Confirmação da colonização endofítica

A confirmação da colonização do fungo nos tecidos vegetais seguiu o método proposto por Parsa (2013), com modificações. Para isso, pedaços (10 cm) de folhas, caules e raízes foram coletados de plantas inoculadas com os isolados de *M. anisopliae* e lavadas separadamente com água destilada estéril. Em câmara de fluxo, os pedaços vegetais foram então desinfetados com imersão em álcool 70% (v v⁻¹) por 2 min, seguido de hipoclorito de sódio a 2,5% (v v⁻¹) por 3 min e novamente em álcool 70% por 1 min, finalizado com imersões sequenciais em três beckers contendo água destilada estéril. Em seguida, as amostras de cada parte da planta foram postas separadamente em placas de Petri estéreis. Visando eliminar a parte interna do tecido que entrou em contato com as substâncias desinfetantes, as bordas externas dos fragmentos foram descartadas. Para verificar se o processo de limpeza das amostras foi eficiente, após a desinfestação superficial e eliminação das bordas, foi feita uma impressão do tecido vegetal esterilizado em meio BDA (batata, dextrose, ágar) Difco[®], seguindo o método proposto por Schultz et al. (1998). Posteriormente, caso fosse detectado o crescimento de microrganismos indesejados nas placas, a amostra correspondente foi eliminada e substituída.

Os pedaços vegetais esterilizados foram cortados em 10 partes (1 cm fragmento⁻¹), com auxílio de um bisturi estéril, e transferidos separadamente para placas de Petri contendo 8 ml de meio BDA seletivo [0,5 g L⁻¹ de ciclohexamida, 0,2 g L⁻¹ de cloranfenicol, 0,002% de acetato de N- dodecil guanidínio (Dodex[®] 450 SC) e 0,01 g L⁻¹ de cristal violeta] proposto por Behie et al. (2015). Feito isso, as placas foram seladas com plástico filme e mantidas em câmara climatizada do tipo BOD (26°C, fotofase de 14 h) durante 15 dias. A confirmação da taxa de colonização endofítica foi feita pela contagem de colônias de *M. anisopliae* que cresceram sobre os fragmentos. A identificação taxonômica dos isolados foi realizada pela observação de conidióforos e conídios em microscópio óptico com aumento de 400× Axio Scope A1 (Carl Zeiss do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) de acordo com Driver et al. (2000) e Brunner-Mendoza et al. (2018).

4.4.5 Análise dos dados

Modelos lineares generalizados (GLMs) pertencentes à família exponencial de distribuições (Nelder and Wedderburn 1972) foram utilizados para análise dos dados

obtidos. A verificação da qualidade do ajuste foi realizada através do gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação (Hinde and Demétrio 1998). Quando foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos, comparações múltiplas (teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$) foram realizadas utilizando-se a função *glht* do pacote *Multcomp*, com ajuste dos valores de p . Todas essas análises foram realizadas utilizando o software estatístico “R” versão 2.15.1 (R Core Team 2019).

As curvas de sobrevivência larval de *S. frugiperda* nos diferentes tratamentos foram analisadas pelo método de Kaplan-Meier, utilizando-se o teste log-rank para comparação dos grupos (tratamentos). Por sua vez, os parâmetros da tabela de vida de fertilidade, tais como o intervalo entre gerações (T), a taxa líquida de reprodução (R_0) e a taxa intrínseca de crescimento (r_m) foram estimados pelo método Jackknife usando o software *Lifetable.SAS* (Maia et al., 2000) e as médias comparados pelo teste t bilateral ($p \leq 0.05$) pelo software SAS® (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com plantas colonizadas.

Lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de plantas colonizadas de *C. dactylon* cv. Tifton 85 com diferentes isolados de *M. anisopliae* apresentaram uma redução na viabilidade da fase larval variável entre 51,20 e 60,92% em relação ao tratamento controle (Tabela 1). Contudo, não foi verificada diferença significativa entre os isolados avaliados. Além disso, verificou-se um significativo incremento na duração da fase larval de *S. frugiperda* entre 7,12 e 9,14 dias (Tabela 1). O isolado CEPAF_ENT 25 acarretou o maior prolongamento da fase larval (± 10 dias em relação ao controle), sem diferir, porém, do isolado IBCB 425 (± 9 dias) (Tabela 1). A mesma tendência foi observada considerando a viabilidade e duração total do desenvolvimento (fase larva-adulto) de *S. frugiperda* alimentadas durante a fase larval com plantas colonizadas com os diferentes isolados de *M. anisopliae* (Tabela 1). Contudo, a duração e viabilidade da fase pupal não foi afetada pelos diferentes tratamentos (Tabela 1).

1 **Tabela 1.** Médias (\pm erro padrão) da viabilidade e duração dos estágios larval, pupal e total (ovo-adulto) de *Spodoptera frugiperda* alimentadas durante toda sua
 2 fase larval com folhas de plantas de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85 colonizadas com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*.
 3

Tratamentos	Viabilidade (%) ¹			Duração (dias) ²		
	Larval	Pupal	Total* (ovo-adulto)	Larval	Pupal ^{ns}	Total (ovo-adulto)
CEPAF_ENT 25	41,00 \pm 4,58 b	87,80 \pm 5,40 a	36,00 \pm 4,52 b	30,00 \pm 0,45 a	9,12 \pm 0,22	42,12 \pm 0,54 a
CEPAF_ENT 27	40,00 \pm 6,50 b	96,60 \pm 2,27 a	38,00 \pm 5,93 b	27,98 \pm 0,71 b	8,48 \pm 0,12	39,45 \pm 0,78 b
IBCB 425	33,00 \pm 5,17 b	94,60 \pm 3,75 a	28,00 \pm 2,91 b	29,07 \pm 0,66 ab	8,79 \pm 0,19	40,86 \pm 0,81 ab
Controle	84,00 \pm 3,40 a	100,00 \pm 0,00 a	84,00 \pm 3,40 a	20,86 \pm 0,19 c	8,94 \pm 0,08	32,81 \pm 0,22 c
F	19,79	7,17	30,10	59,15	2,85	42,89
gl	3, 36	3, 36	3, 36	3, 36	3, 36	3, 36
valor de <i>p</i>	<0,0001	0,0006798	<0,0001	<0,0001	0,0510	<0,0001

4 ¹ Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente (GLM com distribuição quasibinomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p>0,05$);

5 ² Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente (GLM com distribuição Gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p>0,05$);

6 *Para o cálculo da viabilidade total, foi considerado a viabilidade da fase embrionária, conforme testes prévios.

7 ^{ns} = não significativo.

8

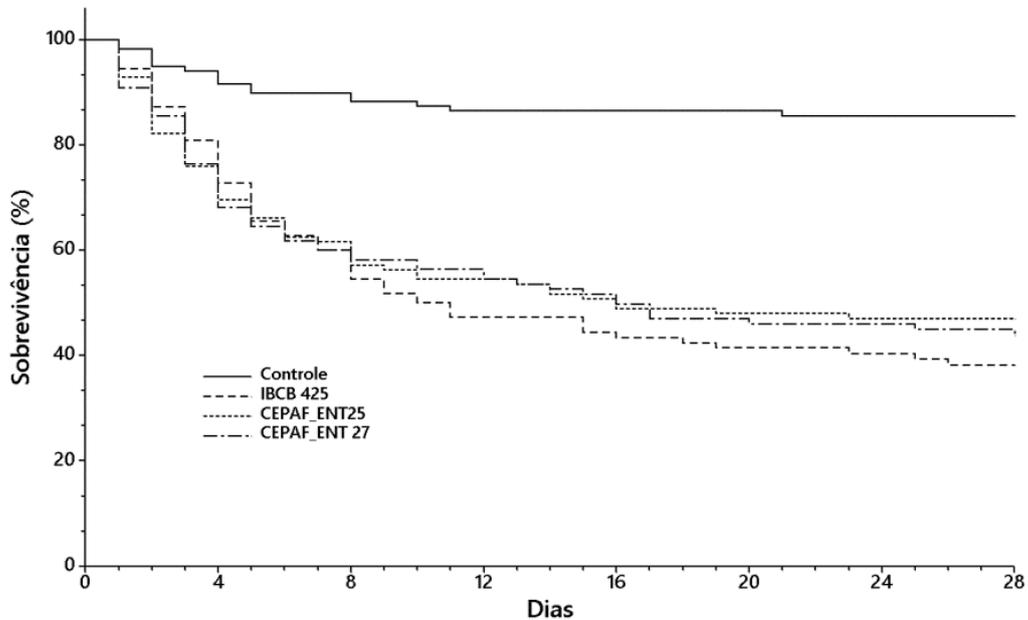
9

10

11

12 Mediante o teste de Keplan-Meier foi verificado diferença significativa ($\chi^2 =$
13 54,72, $df = 3$, $p = <0,0001$) entre as chances de sobrevivência de *S. frugiperda* expostas
14 aos diferentes isolados de *M. anisopliae* em relação ao controle (Tabela 2; Figura 5).
15 Entretanto, não se verificou diferença entre os isolados testados.

16 **Figura 5.** Curvas de sobrevivência estimada (Kaplan-Meier) de lagartas de *Spodoptera*
17 *frugiperda* alimentadas durante sua fase larval com folhas de plantas de *Cynodon dactylon* cv.



18 Tifton 85 colonizadas com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*.

19

20

21 O peso de lagartas ao 8º dia ($F_{(3, 36)} = 71,10$; $p <0,0001$) e de pupas com 24 h
22 ($F_{(3, 36)} = 39,67$; $p <0,0001$) (Figura 6 e 7) foi significativamente reduzido a partir da
23 alimentação de *S. frugiperda* com folhas de plantas colonizadas com os distintos isolados
24 de *M. anisopliae*. No entanto, também não houveram diferenças entre os isolados
25 testados.

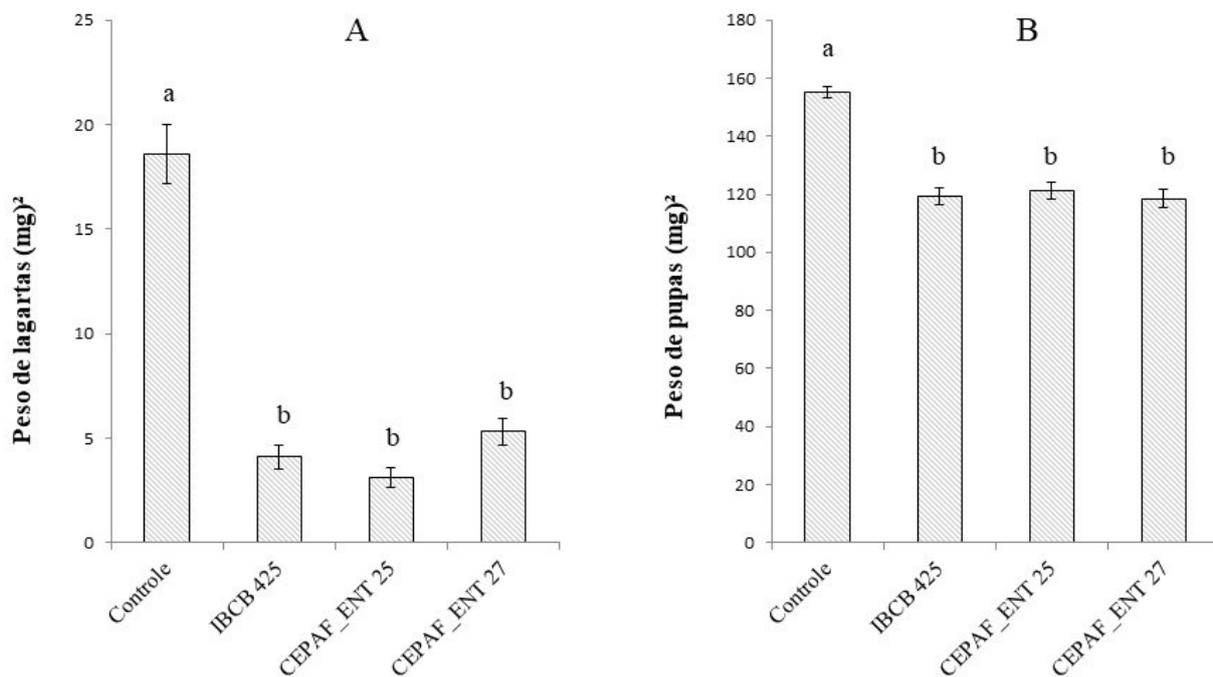
26

27

28

29

30



31 **Figura 6.** Peso de lagartas no 8º dia de vida (A) e de pupas com 24 h (B) de *Spodoptera frugiperda*
 32 alimentadas durante sua fase larval com folhas de plantas de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85
 33 colonizadas com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*.
 34 Médias com a mesma letra não diferem significativamente (GLM com distribuição Gaussiana
 35 seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p > 0,05$). Obs.: As barras em cada tratamento indicam o erro
 36 padrão da média



37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53 **Figura 7.** Pupas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas durante sua fase larval com folhas de
 54 plantas de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85 colonizadas com diferentes isolados de *Metarhizium*
 55 *anisopliae* (A: Controle; B: IBCB 425; C: CEPAF_ENT 25; D: CEPAF_ENT 27).

56 Machos adultos oriundos de lagartas alimentadas durante sua fase larval com
57 folhas de plantas de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85 colonizadas endofitivamente com os
58 isolados CEPAF_ENT 27 e IBCB 425 de *M. anisopliae* apresentaram menor longevidade
59 (Tabela 2). No entanto, não houve diferença entre os tratamentos quando considerado a
60 longevidade de fêmeas e a razão sexual. Em adição, os isolados CEPAF_ENT 25,
61 CEPAF_ENT 27 e IBCB 425 reduziram significativamente a fecundidade total,
62 chegando a uma diminuição de 72,32% (IBCB425), 58,65% (CEPAF_ENT 27) e 46,09%
63 (CEPAF_ENT 25) no número total de ovos/fêmea, em relação ao controle (Tabela 2).

64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83

84
85
86
87
88

Tabela 2. Parâmetros (\pm erro padrão) da fase adulta de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de plantas de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85 colonizadas endofiticamente com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*.

Tratamentos	Longevidade (dias) ¹		Razão sexual ²	Fecundidade total (No. ovos/fêmea) ³
	Machos	Fêmeas		
CEPAF ENT 25	9,73 \pm 0,50 a	10,50 \pm 0,46	0,39 \pm 0,07	474,70 \pm 75,69 b
CEPAF ENT 27	8,41 \pm 0,45 b	10,15 \pm 0,61	0,32 \pm 0,07	364,10 \pm 68,71 b
IBCB 425	7,85 \pm 0,90 b	9,90 \pm 0,55	0,34 \pm 0,07	243,70 \pm 73,77 b
Controle	10,78 \pm 0,43 a	11,40 \pm 0,53	0,39 \pm 0,05	880,60 \pm 117,01 a
F	4,7971	1,4789 ^{ns}	0,1870 ^{ns}	9,3113
gl	3,36	3,36	3,36	3,36
valor de p	0,006518	0,2366	0,904	0,000108

89
90
91
92
93
94

¹ Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente (GLM com distribuição Gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p > 0,05$);

² Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente (GLM com distribuição quasibinomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p > 0,05$);

³ Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente (GLM com distribuição quasipoisson seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p > 0,05$);

^{ns} = não significativo.

4.5.2 Efeito dos diferentes tratamentos em parâmetros da tabela de vida de fertilidade

Lagartas alimentadas com folhas de *C. dactylon* colonizadas pelos diferentes isolados de *M. anisopliae* tiveram os parâmetros de vida de fertilidade significativamente afetados (Tabela 3). O tempo de duração entre gerações (T) não diferiu entre os isolados testados (variável entre 47,8 e 49 dias). Contudo, apresentaram um prolongamento de ~ 10 dias entre gerações em relação ao controle (38,1 dias) (Tabela 3). Em adição, adultos provenientes de lagartas alimentadas com folhas de *C. dactylon* colonizadas com o isolado IBCB 425 apresentou as menores taxas líquidas de reprodução (R_o) ($R_o=19,44$) quando comparado com os isolados CEPAF_ENT 25 ($R_o=44,2$) e CEPAF_ENT 27 ($R_o=38,8$) e tratamento controle ($R_o=276,6$) (Tabela 3). Além disso, o desenvolvimento de *S. frugiperda* em folhas de *C. dactylon* colonizadas com os isolados de *M. anisopliae* afetou a taxa intrínseca de crescimento (r_m), indicando redução de 41 a 48% na capacidade de aumento populacional da praga em relação ao tratamento controle (Tabela 3). No que se refere à razão finita de aumento (λ), o crescimento populacional diário de *S. frugiperda* foi menor em ambos os tratamentos que apresentaram a presença de *M. anisopliae* (aproximadamente 10%) (Tabela 3), comparado com o tratamento controle.

Tabela 3. Tabela de vida de fertilidade de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85 colonizadas com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*.

Tratamentos	T (dias)	R_o (♀ / ♀)	r_m (♀ / ♀*day)	λ
CEPAF_ENT 25	49,0 ± 0,38 b	44,2 ± 10,36 b	0,077 ± 0,004 b	1,080 ± 0,003 b
CEPAF_ENT 27	47,8 ± 0,23 b	38,8 ± 6,77 b	0,076 ± 0,003 b	1,079 ± 0,003 b
IBCB 425	48,2 ± 0,49 b	19,44 ± 6,39 c	0,062 ± 0,007 b	1,064 ± 0,007 b
Controle	38,1 ± 0,09 a	276,6 ± 67,64 a	0,148 ± 0,006 a	1,159 ± 0,007 a

T = Tempo da duração entre gerações; R_o = taxa líquida de reprodução, r_m = Razão infinitesimal de aumento e λ = Razão finita de aumento. Valores representam a média ± EP obtidos a partir do método de Jackknife através do programa SAS. Para cada parâmetro avaliado, valores seguidos pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

4.5.3 Consumo foliar e preferência de oviposição de *S. frugiperda* em plantas colonizadas

Não houve diferença significativa no consumo foliar de *S. frugiperda* em folhas de *C. dactylon* cv. Tifton 85 obtidas de plantas colonizadas endofiticamente com diferentes isolados de *M. anisopliae*, em teste com chance de escolha (Tabela 4). Entretanto, em teste sem chance de escolha, o maior consumo foliar de lagartas de 3° instar de *S. frugiperda* foi verificado em folhas obtidas de plantas colonizadas com os isolados CEPAF_ENT 25 e CEPAF_ENT 27 ($\pm 1,70$ cm), que diferiram estatisticamente do controle (0,94 cm) (Tabela 4). Em contraste, os diferentes isolados de *M. anisopliae* testados não afetaram a preferência de oviposição de *S. frugiperda* em plantas de *C. dactylon* cv. Tifton 85 colonizadas (Tabela 5).

Tabela 4. Consumo foliar (\pm erro padrão) de lagartas de 3° instar de *Spodoptera frugiperda* em discos de folhas de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85 colonizadas com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*, em teste com e sem chance de escolha.

Tratamentos	Consumo foliar (cm ²)	
	Com chance de escolha	Sem chance de escolha ¹
CEPAF_ENT 25	0,44 \pm 0,08	1,64 \pm 0,16 a
CEPAF_ENT 27	0,41 \pm 0,08	1,76 \pm 0,14 a
IBCB 425	0,29 \pm 0,07	1,29 \pm 0,15 ab
Controle	0,28 \pm 0,05	0,94 \pm 0,10 b
F	1,2076 ^{ns}	6,9307
gl	3, 136	3, 136
valor de <i>p</i>	0,3095	0,0002

^{ns} Não significativo (GLM com distribuição Gaussiana, $p > 0,05$);

¹Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente (GLM com distribuição Gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, $p > 0,05$).

Tabela 5. Médias (\pm erro padrão) do número de posturas de do número de ovos cm^{-2} de mariposas de *Spodoptera frugiperda* em plantas de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85 colonizadas com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*.

Tratamentos	No. posturas	No. ovos cm^{-2}
CEPAF_ENT 25	2,40 \pm 0,45	6,71 \pm 1,54
CEPAF_ENT 27	2,30 \pm 0,43	7,59 \pm 2,30
IBCB 425	2,25 \pm 0,39	6,12 \pm 1,86
Controle	1,95 \pm 0,39	6,86 \pm 2,11
F	0,223 ^{ns}	0,0947 ^{ns}
gl	3, 76	3, 76
valor de <i>p</i>	0,8801	0,9628

^{ns} Não significativo (GLM com a distribuição quasi-Poisson, $p > 0,05$).

4.6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a alimentação de lagartas de *S. frugiperda* com folhas de plantas de *C. dactylon* cv. Tifton 85 colonizadas endofiticamente pelos 3 isolados estudados (CEPAF_ENT 25, CEPAF_ENT 27 e IBCB 425) de *M. anisopliae* acarretaram prejuízos consideráveis no desempenho biológico da espécie, especialmente na tabela de vida de fertilidade. Este fato reflete significativamente nos atributos demográficos em condições de campo e nos danos em pastagens de grama-bermuda. Estudos prévios também indicaram o potencial inibitório de fungos entomopatogênicos endofíticos sobre lepidópteros-praga de diferentes espécies de plantas cultivadas (Russo et al. 2019; Kuchár et al. 2019; Mahmoud et al. 2020). Porém, este é o primeiro relato da interação endofítica entre *M. anisopliae* e uma cultivar de grama-bermuda e seu impacto sobre uma espécie-praga desfolhadora.

Distintos métodos de inoculação têm sido utilizados para induzir a associação protooperativa entre fungos entomopatogênicos e plantas de interesse agrícola. De Lira et al. (2021) inocularam conídios de diferentes espécies de *Metarhizium* na forma de revestimento de sementes de milho (*Zea mays* L., Poaceae) e verificaram maior crescimento vegetal e redução na sobrevivência de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de plantas inoculadas. No presente estudo, a aplicação da suspensão de conídios (1×10^8 conídios ml^{-1}) foi realizada na base de touceiras estabelecidas de *C. dactylon* cv. Tifton 85, simulando a forma de aplicação de *Metarhizium* spp. em condições de campo para o manejo de cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera:

Cercopidae) (Pitta et al. 2019). Esse método de inoculação demonstrou ser efetivo na promoção da colonização endofítica das plantas inoculadas, que tiveram a presença de *M. anisopliae* confirmada em todas as partes das plantas analisadas (raízes, colmos e folhas).

Os resultados obtidos demonstraram um efeito antagonista de isolados de *M. anisopliae*, via colonização endofítica, na sobrevivência, desenvolvimento e reprodução de *S. frugiperda*. Os efeitos depreciativos em sua biologia foram observados já nos primeiros dias da exposição, conforme verificado nas curvas de sobrevivência estimada para cada tratamento. Além da menor viabilidade, lagartas alimentadas com plantas colonizadas com o fungo também tiveram um retardamento (dias) no desenvolvimento larval e nos parâmetros reprodutivos de taxa líquida de reprodução, razão infinitesimal de aumento e razão finita de aumento. Tais efeitos podem proporcionar menores danos nas plantas, em condições de campo, ou mesmo na manutenção das populações da praga em patamares inferiores aos níveis de controle estabelecidos, dispensando a adoção de medidas complementares de manejo e facilitando a ação de outras táticas de controle (p. ex.: controle biológico natural ou aplicado).

Nossos resultados corroboram estudos já realizados, que indicaram a pronunciada ação inibidora do desenvolvimento de fungos entomopatogênicos aplicados como endofíticos sobre pragas agrícolas de diferentes culturas de importância agrícola (Castillo-Lopez et al. 2014; Garrido-Jurado et al. 2016; Jaber and Ownley 2017; Ramos et al. 2020), um aspecto pouco explorado na elaboração de produtos ou na divulgação das multifuncionalidades de micoinseticidas. Mwamburi (2021) introduziu larvas de *S. frugiperda* em tomateiros colonizados endofiticamente com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) e *M. anisopliae*, e verificou uma significativa redução da sobrevivência das larvas e atrasos em seu desenvolvimento. As lagartas alimentadas com folhas de plantas de tomate inoculadas, principalmente com *M. anisopliae*, apresentaram um menor peso e não atingiram a fase de pupa. Em outro estudo, Resquín-Romero et al. (2016) combinaram pulverizações diretas de conídios com fornecimento de folhas de plantas de alfafa, melão e tomate colonizadas com *B. bassiana* e *Metarhizium brunneum* (Metsc.) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) para lagartas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae), verificando efeitos aditivos entre os métodos e proporcionando mortalidades significativas dos indivíduos

expostos. Todavia, a potencialidade e intensidade de tais resultados é dependente das variações existentes entre diferentes isolados e as especificidades das plantas hospedeiras.

Apesar dos poucos estudos disponíveis, o antagonismo de fungos entomopatogênicos endofíticos são frequentemente atribuídos a produção de metabólitos secundários ou a indução de respostas sistêmicas nas plantas colonizadas (Jaber and Owley 2018; Canassa et al. 2020; Garrido-Jurado et al. 2020). Estudos também indicaram a presença de apoptose celular em cadáveres de insetos alimentados com plantas endofiticamente colonizadas com entomopatógenos, o que pode ser resultado da translocação dos metabólitos fúngicos pelos tecidos vegetais (Garrido-Jurado et al. 2017). Esses metabólitos, como as destruxinas, já foram observadas em pequenas concentrações dentro de tecidos de plantas inoculadas com espécies de *Metarhizium* (Golo et al. 2014; De Lira et al. 2020). Essas substâncias exercem efeitos inseticidas e antialimentares em insetos, e uma vez dentro das plantas, podem promover a ativação de um sistema de degradação de toxinas nas lagartas fitófagas, consumindo energia que seria destinada ao crescimento corporal (Quesada-moraga et al. 2006; Garrido-Jurado et al., 2017; Kamaraj et al. 2018). Resquín-Romero et al. (2016) detectaram destruxina A em 11% dos cadáveres de lagartas de *S. litoralis* alimentadas com discos foliares de tomateiros colonizados endofiticamente, mas não observaram crescimento de estruturas fúngicas sobre os insetos mortos. Em nosso estudo não foi verificado a extrusão ou esporulação de fungos sobre lagartas mortas, mesmo em condições ambientais ótimas, o que comumente acontece em estudos dessa natureza (ver revisão de Jaber and Owley, 2018). Assim, possivelmente a indução de aleloquímicos constitutivos pode ser a causa da bioatividade observada, fato a ser mais bem investigado em futuros estudos.

Plantas inoculadas com fungos endofíticos podem expressar diferentes respostas a colonização, inclusive no perfil volátil e na secreção de metabólitos secundários (Garrido-Jurado et al. 2020). Estudos mostraram a biossíntese de metabólitos secundários, como terpenoides, acima do normalmente observado em plantas colonizadas com *B. bassiana* e *M. anisopliae* (De Lira et al. 2020). Estes metabólitos podem influenciar diretamente no comportamento de seleção hospedeira e no desempenho biológico dos artrópodes expostos. Em nossos testes de preferência de alimentação e de oviposição, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos (Tabela 4). Resultados divergentes entre esses aspectos são reportados na literatura, incluindo estudos que

atestam a preferência de lagartas por plantas colonizadas endofiticamente (Allegrucci et al. 2017; Vianna et al. 2018; Vinha 2018) ou mesmo por plantas do tratamento controle (Russo et al. 2020; Garrido-Jurado et al. 2020).

Conhecer as interações de fungos entomopatogênicos com plantas forrageiras e sua influência sobre outras pragas-chave de pastagens, como *S. frugiperda*, é importante para elucidar os potenciais efeitos da aplicação de micoinseticidas, seu espectro de atividades e seus benefícios aos programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) e ao agroecossistema. Nessa linha, nossos resultados indicam que os isolados CEPAF_ENT 25, CEPAF_ENT 27 e IBCB 425 apresentam múltiplos espectros de ação e potencial na geração de novos produtos biológicos à base de *M. anisopliae* a serem ofertados ao mercado.

4.7 REFERÊNCIAS

Ahmad I, del Mar Jiménez-Gasco M, Luthe DS, Shakeel SN, Barbercheck ME (2020) Endophytic *Metarhizium robertsii* promotes maize growth, suppresses insect growth, and alters plant defense gene expression. *Biocontrol*, 144: 104-167.

Allegrucci N, Velazquez MS, Russo ML, Perez E, Scorsetti AC (2017) 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 Plant Prot Res*, 57: 331–337.

Behie, SW, Moreira CC, Sementchoukova I, Barelli L, Zelisko PM, Bidochka MJ (2017) Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. *Nat Commun* 8: 142 145.

Bischoff JF, Rehner SA, Humber RA (2009) A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101 (4): 512–530. doi:10.3852/07-202

Boaventura D, Martin M, Pozzebon A, Mota-Sanchez D, Nauen R (2020) Monitoring of target-site mutations conferring insecticide resistance in *Spodoptera frugiperda*. *Insects*, 11 (8) 545.

Brunner-Mendoza C, Reyes-Montes MR, Moonjely S, Bidochka MJ, Toriello C. (2018). A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. *Biocontrol Science and Technology*, 1–20. doi:10.1080/09583157.2018.1531111

Canassa F, D'Alessandro CP, Sousa SB, Demétrio CGB, Meyling NV, Klingen I, Delalibera I (2020) Fungal isolate and crop cultivar influence the beneficial effects of root inoculation with entomopathogenic fungi in strawberry. *Pest Manag*, 76 (4), 1472-1482.

Carvalho RA, Omoto C, Field LM, Williamson MS, Bass C (2013) Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *PloS One* 8: 262-268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062268>.

Castillo-Lopez D, Zhu-Salzman K, Ek-Ramos MJ, Sword GA (2014) The entomopathogenic fungal endophytes *Purpureocillium lilacinum* (formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Beauveria bassiana* negatively affect cotton aphid reproduction under both greenhouse and field conditions. *PLoS ONE*, 9 (116): 53- 61.

Chiaradia LA, Miranda M, Fedatto VJJ (2013) Flutuação populacional de cigarrinhas-das-pastagens na grama-missioneira-gigante. *Agro Catarinense*, 26 (1): 70-75.

Cruz IA (1995) lagarta-do-cartucho na cultura do milho. *Embrapa* 21: 5–6.

De Lira AC, Mascarin GM, Júnior ID (2020) Microsclerotia production of *Metarhizium* spp. for dual role as plant biostimulant and control of *Spodoptera frugiperda* through corn seed coating. *Fungal Biol*, 124 (8): 689-699.

Driver F, Milner RJ, Trueman JWH (2000) A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol Res*, 104(2): 134–150. doi:10.1017/s0953756299001756

Ebora RV, Ebora MM, Sticklen MU (1991) Transgenic potato expressing the *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) gene effects on the survival and food consumption of *Phthorimea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera). *J Econ Entomol*, 87 (4): 1122-1127.

EPPO. EPPO Global Database. Available online: <http://gd.eppo.int> (accessed on 10 de janeiro de 2022).

Fan, J., Wu, P., Tian, T., Ren, Q., Haseeb, M., & Zhang, R. (2020). Potential distribution and niche differentiation of *Spodoptera frugiperda* in Africa. *Insects*, 11(6), 383.

Flonc B, Barbercheck M, Ahmad I (2021) Observations on the Relationships between Endophytic *Metarhizium robertsii*, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), and Maize. *Pathogens*, 10 (6), 713.

Garrido-Jurado I, Montes-Moreno D, Sanz-Barrionuevo P, Quesada-Moraga E (2020) Delving into the causes and effects of entomopathogenic endophytic *Metarhizium brunneum* foliar application-related mortality in *Spodoptera littoralis* larvae. *Insects*, 11 (7): 429.

Golo PS, Gardner DR, Grilley MM, Takemoto JY, Krasnoff SB, Pires MS, Roberts DW (2014) Production of Destruxins from *Metarhizium* spp. Fungi in Artificial Medium and in Endophytically Colonized Cowpea Plants. *PLoS ONE*, 9 (8), e104946. doi:10.1371/journal.pone.0104946

Jaber LR, Ownley BH (2018) Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens?. *Bio Control*, 116: 36-45.

Jaber LR, Ownley BH (2018) Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biol Control* 116: 36–45.

Kamaraj C, Gandhi PR, Elango G, Karthi S, Chung IM, Rajakumar G (2018) Novel and environmental friendly approach; Impact of Neem (*Azadirachta indica*) gum nano formulation (NGNF) on *Helicoverpa armigera* (Hub.) and *Spodoptera litura* (Fab.). *Int J Bio Macromol*, 107 (8): 59-69.

Leuck DB, Perkins WD (1972) A Method of Estimating Fall Armyworm Progeny Reduction When Evaluating Control Achieved by Host-Plant Resistance. *J Econ Entomol*, 65 (2): 482-483.

Liu, T., Wang, J., Hu, X., & Feng, J. (2020). Land-use change drives present and future distributions of Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). *Science of The Total Environment*, 706, 135872.

Lovatto M, Ribeiro LP (2017) Manejo das cigarrinhas-das-pastagens com fungos entomopatogênicos. *Agro Catarinense*, 30 (2): 42-46.

Lohmann TR, Pietrowski V, Bressan DF (2010) Flutuação populacional de cigarrinhas-daspastagens na região Oeste do Paraná. *Semina*, 31: 1291-1298.

Mantzoukas S, Eliopoulos, PA (2020) Endophytic entomopathogenic fungi: A valuable biological control tool against plant pests. *Applied Sciences*, 10 (1) 360.

Mosallanejad H, Smagghe G Biochemical mechanisms of methoxyfenozide resistance in the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *Pest Manag. Sci.* 2009, 65, 732–736. [CrossRef]

Montezano DG, Sosa-Gómez DR, Specht A, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Paula-Moraes SD, Hunt TE (2018) Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *Afric entomol*, 26 (2): 286-300.

Mwamburi LA (2021) Endophytic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, confer control of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), in two tomato varieties. *Egypt J Biol Pest Control*, 31 (1). doi:10.1186/s41938-020-00357-3

Parsa S, Ortiz V, Vega FE (2013) Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. *JoVE*, 74, 350-360.

Pitta RM, Matiero SC, Corassa JDN, Rampelotti-Ferreira, FT (2019) Influence of pastoral systems on *Mahanarva spectabilis* (Distant) (Hemiptera: Cercopidae) and the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Embrapa Agrossilvipastoril*,.

Prakash P, Bhanu GVS, Padmaja V, Kiran RR (2008) Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresour Technol*, 99 (6): 1530-1537.

Quesada-Moraga E, Carrasco-Diaz JA, Santiago-Alvarez C (2006) Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *J App Entomol*, 130 (8): 442–452. doi:10.1111/j.1439-0418.2006.01079.x

Quesada Moraga E (2020) Entomopathogenic fungi as endophytes: their broader contribution to IPM and crop production. *Biocontrol Sci Technol*, 30 (9): 864-877.

Ramos Y, Taibo AD, Jiménez JA, Portal O (2020) Endophytic establishment of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in maize plants and its effect against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Egypt J Bio Pest Cont*, 30(1). doi:10.1186/s41938-020-00223-2

Resquín-Romero G, Garrido-Jurado I, Delso C, Ríos-Moreno A, Quesada-Moraga E (2016) Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects. *J Invertebr Pathol*, 136: 23–31. doi:10.1016/j.jip.2016.03.003

Ribeiro LP, Cazarotto AR (2019) Cigarrinhas-das-pastagens em Santa Catarina: avaliação do complexo de espécies e da incidência natural de fungos entomopatogênicos. *Agropecuária Catarinense*, 32 (2): 73-79.

Ribeiro LP, Klock ALS, Nesi CN, Luczkiewicz FRG, Travi MRL, Rech, AF (2020) Adaptability and Comparative Biology of Fall Armyworm on Maize and Perennial Forage Species and Relation with Chemical-Bromatological Composition. *Neotrop Entomol*, 49(5), 758-767. doi:10.1007/s13744-020-00794-7

Ribeiro LP, Castlhos RV (2018) Manejo integrado de pragas em pastagens: ênfase em pragas-chave das gramíneas perenes de verão. *Agro Catarinense*, 51-51.

Russo ML, Jaber LR, Scorsetti AC, Vianna F, Cabello MN, Pelizza SA (2020) Effect of entomopathogenic fungi introduced as corn endophytes on the development, reproduction, and food preference of the invasive fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *J Pest Sci*, 94(3), 859-870. doi:10.1007/s10340-020-01302-x

Schultz B, Guske S, Dammann U, Boyle C (1998) Endophyte–host interactions II. Defining symbiosis of the endophytest interaction. *Symbiosis* 25: 213–227.

Shalan, RS, Gerges E, Habib W, Ibrahim L (2021) Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* induces growth promotion effect and increases the resistance of cucumber plants against *Aphis gossypii*. *J. of Plant Prot Res*, 61 (4): 358-370.

Sullivan CF, Parker BL, Skinner M (2022) A Review of Commercial *Metarhizium*-and *Beauveria*-Based Biopesticides for the Biological Control of Ticks in the USA. *Insects*, 13 (3): 260-268.

Tepa-Yotto GT, Tonnang HE, Goergen G, Subramanian S, Kimathi E, Abdel-Rahman EM, Sæthre, MG (2021) Global habitat suitability of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera, Noctuidae): Key parasitoids considered for its biological control. *Insects*, 12 (4), 273.

Vianna F, Pelizza S, Russo L, Allegrucci N, Scorsetti A (2018) Endophytic *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) alters *Helicoverpa gelotopoeon*'s (D.) (Lepidoptera: Noctuidae) life cycle and reproductive parameters. *J Plant Prot Res*, 58: 321–327.

Vinha FB (2018) Potential of inoculation of entomopathogenic fungi in soybean planting for pest management. *Dissertação*, Universidade de São Paulo.

Yu SJ (1991) Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). *Pest Biochem Phys*, 39 (1) 84-91.

Zimmermann G, Review on Safety of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii* (2007). *Biocontrol Sci Technol*, 17(5): 553-596.