

COLONIZAÇÃO DO FUNGO *Beauveria bassiana* (HYPOCREALES, ASCOMYCOTA) NA FORMA ENDOFÍTICA EM PLANTAS DE TOMATE *Solanum lycopersicum* (SOLANACEAE) VISANDO O CONTROLE DE *Tuta absoluta* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE).

ANA CAROLINA LORETI SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO - 2020

COLONIZAÇÃO DO FUNGO *Beauveria bassiana* (HYPOCREALES,
ASCOMYCOTA) NA FORMA ENDOFÍTICA EM PLANTAS DE
TOMATE *Solanum lycopersicum* (SOLANACEAE) VISANDO O
CONTROLE DE *Tuta absoluta* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE).

ANA CAROLINA LORETI SILVA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Dr. Richard Ian Samuels

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

5586

Silva, Ana Carolina Loreti.

COLONIZAÇÃO DO FUNGO *Beauveria bassiana* (HYPOCREALES, ASCOMYCOTA) NA FORMA ENDOFÍTICA EM PLANTAS DE TOMATE *Solanum lycopersicum* (SOLANACEAE) VISANDO O CONTROLE DE *Tuta absoluta* (LEPIDOPTERA : GELECHIIDAE). / Ana Carolina Loreti Silva. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

51 f. : il.

Bibliografia: 33 - 38.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.
Orientador: Richard Ian Samuels.

1. Inseto. 2. Endofíticos. 3. Patógenos. 4. Praga. 5. Tomateiro. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

COLONIZAÇÃO DO FUNGO *Beauveria bassiana* (HYPOCREALES,
ASCOMYCOTA) NA FORMA ENDOFÍTICA EM PLANTAS DE
TOMATE *Solanum lycopersicum* (SOLANACEAE) VISANDO O
CONTROLE DE *Tuta absoluta* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE)

ANA CAROLINA LORETI SILVA

Dissertação apresentada ao Centro de
Ciências e Tecnologias Agropecuárias da
Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestra em
Produção Vegetal.

Aprovado em 20 de fevereiro de 2020

Comissão Examinadora



Dr^a. Aline Teixeira Carolino (D.Sc. Produção Vegetal) – UENF



Prof. Dr. Gerson Adriano Silva (D.Sc. Fitotecnia) – UENF (Coorientador)



Prof. Dr. Milton Erthal Jr. (D.Sc. Produção Vegetal) – IFF



Prof. Richard Ian Samuels (Ph.D. Patologia de Insetos) – UENF
(Orientador)

“A Deus e aos meus pais, Maura Vaz Loreti e Luiz Antonio, DEDICO este trabalho, por estarem sempre ao meu lado, por todo amor e cuidado, amo vocês”.

AGRADECIMENTO

A Deus, que me guia por todos os caminhos e por ter tornado possível cada conquista, alegria, vitória e aprendizado.

Aos meus pais, Maura Vaz Loreti e Luiz Antonio da Silva, meus maiores exemplos de humildade, sabedoria e persistência, que me educaram, apoiaram e estiveram sempre presentes em todos os momentos, por todo cuidado e amor a mim dedicado.

Aos meus padrinhos, Glaucia Vilela dos Santos e Marcio Vaz Loreti, que sempre me apoiaram e acreditam em mim, me ajudaram em cada conquista e em oração.

A minha tia Maria das Graças Loreti por toda oração, amor e confiança;

Aos meus primos e amigos Guilherme Vilela Loreti, Vinicius Vilela Loreti, Milce Aparecida Navas Loreti, Bruniele Loreti Bernardes, Kauã Bernardes, Sarah Loreti e Helena Maria por todo incentivo, amor, confiança e carinho.

Aos meus tios Milson Vaz Loreti e Aparecida Navas Loreti por todo carinho, apoio e amor.

Aos meus amigos Braz Francisco Nogueira e Rejane Aparecida da Rocha, pela amizade, confiança e apoio.

A minha amiga e companheira de todos os momentos Patrícia Batista de Oliveira, que esteve sempre ao meu lado desde o início dessa jornada. Agradeço por todos os momentos que vivemos e tudo que passamos, serei sempre grata a Deus pela sua amizade, o melhor presente que ganhei no mestrado.

A todos os meus amigos, principalmente aqueles que estiveram presentes, sempre ao meu lado, Thais de Moraes Ferreira, Isamara Reis Gomes, Gabriela, Jarbas Cissino Massambe, Felipe da Silva Costa, Marcus Vinicius Bastos, Everton Soares e Damião Vilela, por todos os momentos vividos, pelos conselhos, apoio e carinho.

Às amigas Isabela, Isamara, Jessica e Bianca, pela convivência diária como família, pela união e por todos os momentos, serei sempre grata a Deus por ter colocado pessoas boas em meu caminho.

Aos grandes amigos que fiz no laboratório, os quais compartilharam conhecimentos e ensinamentos diários, que tornaram essa jornada mais feliz e agradável, minha eterna gratidão, especialmente à Dr.^a Denise Moreira, Dr.^a Aline Teixeira Carolino e Ms. Thais Berçot.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e ao Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF), pela oportunidade de realização deste curso.

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

Ao Professor Dr. Richard Ian Samuels pelos ensinamentos, apoio e orientação.

Ao Professor Dr. Gerson Adriano Silva pela coorientação.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Cultura do tomate	4
2.2. <i>Tuta absoluta</i>	5
2.3. Controle biológico com fungos entomopatogênicos	6
2.4. Uso de Fungos Entomopatogênicos no controle de <i>T. absoluta</i>	8
2.5. Fungos entomopatogênicos endofíticos.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Origem dos fungos utilizados	12
3.2. Criação de <i>T. absoluta</i>	12
3.3. Preparo das suspensões fúngicas	13
3.4. Teste de patogenicidade de diferentes isolados de <i>Beauveria</i> em larvas de <i>T. absoluta</i>	13

3.5. Colonização de plantas de tomate com fungos entomopatogênicos	14
3.6. Inoculação de Plântulas de tomate	16
3.7. Bioensaios de efeitos das plantas colonizadas com fungo em <i>T. absoluta</i> .	17
3.8. Avaliação de parâmetros agronômicos	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Teste de patogenicidade utilizando três isolados de <i>B. bassiana</i> em larvas de <i>T. absoluta</i>	19
4.2. Colonização artificial de <i>B. bassiana</i> em tomateiros.....	20
4.3. Colonização de plantas de tomate a partir da inoculação de plântulas.....	22
4.4. Bioensaios de sobrevivência de larvas de <i>T. absoluta</i> expostas a tomateiro colonizado por <i>B. bassiana</i>	24
4.5. Avaliação de parâmetros agronômicos	27
5. RESUMO E CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS	33

RESUMO

SILVA, ANA CAROLINA LORETI, M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2020. Colonização do fungo *Beauveria bassiana* (HYPOCREALES, ASCOMYCOTA) na forma endofítica em plantas de tomate *Solanum lycopersicum* (SOLANACEAE) visando o controle de *Tuta absoluta* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) (Meyrick, 1917). Orientador: Richard Ian Samuels. Coorientador: Gerson Adriano Silva

A traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) é um dos principais insetos-praga do tomate (*Solanum lycopersicum*), causando danos aos frutos e reduzindo a produção de tomate. Após anos do uso constante de inseticidas sintéticos, tem ocorrido uma busca crescente por métodos de controle biológico, dentre os quais o uso de patógenos. Neste contexto, os fungos entomopatogênicos, têm se apresentado como uma saída promissora na proteção de culturas contra insetos-praga. O objetivo deste estudo foi investigar o potencial do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (HYPOCREALES, ASCOMYCOTA) na forma endofítica em plantas de tomate, visando o controle de *T. absoluta*. Foram realizados testes de patogenicidade com três isolados fungos entomopatogênicos (LPP139, LEF140, LEF141), contra larvas de *T. absoluta*. Os isolados também foram utilizados para inocular plantas de tomate, com o objetivo de reisolar o fungo mais promissor. Após inocular e isolar *B. bassiana* do tomate, o fungo reisolado (LPP139) foi então utilizado para inoculação em plântulas de tomate, e a colonização fúngica das plântulas, foi avaliada 7, 14, 21 e 30 dias após a inoculação. Plantas colonizadas com *B. bassiana* endofítica foram

utilizadas em teste de antagonismo contra larvas de *T. absoluta*. Os resultados mostraram que todos os isolados testados eram patogênicos e virulentos contra larvas de *T. absoluta*. No entanto, apenas o isolado LPP139 foi reisolado nas plantas de tomate, portanto, esse isolado foi utilizado para inoculação em plântulas. A colonização de tomateiro pela inoculação de sementes com conídios de *B. bassiana* foi bem-sucedida. As plantas colonizadas com *B. bassiana* endofítica foram eficientes na redução de sobrevivência de larvas de *T. absoluta* que se alimentam das folhas. Os tratamentos diferiram significativamente ($P < 0,0001$) do grupo controle. As larvas expostas a plantas de tomate colonizadas com *B. bassiana* apresentaram a sobrevivência média de 4 dias (S_{50}), e 100% de mortalidade no 7º dia de avaliação. Já o grupo controle apresentou sobrevivência de 87,5% nas duas variedades de tomateiro. O isolado LPP139 de *B. bassiana* colonizou de forma eficiente plantas de tomate via inoculação de plântulas, e foi detectado por até 30 dias após o contato inicial. As plantas colonizadas com fungos na forma endofítica foram eficientes, sendo utilizado o fungo patogênico para as larvas de *T. absoluta*, sem causar efeitos negativos no crescimento das plantas, indicando o potencial deste fungo e da metodologia de colonização endofítica, para estratégias de proteção de plantas de tomate.

Palavras-chave: Patógeno, fungo, inseto, praga, manejo.

ABSTRACT

SILVA, ANA CAROLINA LORETI, M.Sc. University State Northe Fluminense Darcy Ribeiro. February 2020. Colonization of the fungus *Beauveria bassiana* (HYPOCREALES, ASCOMYCOTA) as an endophyte in tomato plants *Solanum lycopersicum* (SOLANACEAE) for the control of *Tuta absoluta* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) (Meyrick, 1917). Advisor: Richard Ian Samuels. Co-advisor: Gerson Adriano Silva.

The tomato moth *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) is one the main pest insects of tomato (*Solanum lycopersicum*), causing damage to fruits and reducing tomato production. After years of constant synthetic insecticide use, there is an increasing search for biological control methods, among which the use of pathogens, such as entomopathogenic fungi, has shown promise in protecting crops against insect pests. The aim of this study was to investigate the potential of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (HYPOCREALES, ASCOMYCOTA) as an endophyte in tomato plants, simplifying *T. absoluta* control. Pathogenicity tests in were carried out with three *B. bassiana* isolates (LPP139, LEF140, LEF141) against *T. absoluta* larvae. These isolates were also used to inoculate tomato plants, with the aim of re-isolating the most promising fungus. After inoculating and isolating *B. bassiana* from tomato, LPP139 was then used to inoculate tomato seedlings. Fungal colonization of the plants was evaluated 7, 14, 21 and 30 days after inoculation. Plants colonized with endophytic *B. bassiana* were used in antagonism tests against *T. absoluta* larvae. The results indicated

that all of the isolates tested were pathogenic and virulent against *T. absoluta* larvae. However, only LPP139 was isolated from tomato plants, and therefore used for seedling inoculation. The colonization of tomato by seedling inoculation with *B. bassiana* conidia was successful. Plants colonized with endophytic *B. bassiana* were efficient in killing *T. absoluta* larvae that feed on the leaves. The survival rates differed significantly ($P < 0.0001$) from the control group. Larvae exposed to tomato plants colonized with *B. bassiana* had an S_{50} value of 4 days and 100% mortality on the 7th day of evaluation, while the control group survival was 87.5% in both tomato varieties. *Beauveria bassiana* LPP139 efficiently colonized tomato plants via seedling inoculation, and was detected for up to 30 days after inoculation. Plants colonized with fungi in the endophytic form were efficient, reducing survival of *T. absoluta* larvae, without causing negative effects on the growth of the plants, indicating the potential of the fungus and this endophytic colonization methodology as a protection strategy for tomato plants.

Keywords: Pathogen, fungus, insect, pest, management.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do tomate (*Solanum lycopersicum*) é afetada por diferentes insetos-praga. A utilização de pesticidas de amplo espectro de ação é a principal forma de controle das pragas. Porém, o uso exclusivo de controle químico em proporções excessivas contribui para a contaminação do meio ambiente, e prejudica a saúde humana (Gravena, 1984; Pratissoli e Parra, 2001).

Na América do Sul e América Central a traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), tem sido descrita como a praga-chave de tomate, podendo ocasionar perdas de produção de até 100% (Picanço et al., 1999). Os problemas fitossanitários relacionados a *T. absoluta*, representam uma barreira à produtividade na cultura do tomateiro. As larvas de *T. absoluta* minam as folhas, perfuram o caule e as brotações das plantas, ocasionando perda na capacidade fotossintética da planta. Ao atacar frutos de tomate, as larvas causam perdas de frutos comprometendo a produção (Guedes e Picanço, 2012; Guedes et al., 2019).

O controle químico com aplicação de inseticidas é a medida de controle mais adotada. Porém o hábito minador das larvas reduz a eficiência dos inseticidas empregados, devido à baixa capacidade de translocação desses produtos nas plantas de tomate, dificultando o manejo (Silva et al., 2011). Além disso, o uso acentuado de inseticidas aumenta os custos de produção (Guedes e Siqueira; 2019).

Em sistemas agrícolas há uma crescente necessidade de aprimorar técnicas e estudos acerca de novos agentes, e métodos menos agressivos para o

controle de pragas. O controle biológico, com a utilização de parasitoides, predadores e patógenos, tem potencial para restabelecer o equilíbrio de populações de pragas. Os patógenos têm a capacidade de causar infecção e alterações fisiológicas no hospedeiro. Os fungos entomopatogênicos são patógenos que se destacam pela patogenicidade e virulência em diversas espécies de insetos (De Bach e Rosen, 1991). Os fungos são eficazes na regulação de populações de insetos, ademais, as epizootias naturais causadas por fungos desempenham um papel determinante no controle de populações de insetos (Ferron, 1978).

Um dos principais desafios à adoção de uso de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no agroecossistema, está relacionado às necessidades de condições climáticas específicas para que eles se desenvolvam. As condições em campo podem reduzir a eficiência destes patógenos, por exemplo, exposição à luz ultravioleta, restrições de umidade e altas temperaturas (Vega, 2018). A eficiência de fungos contra insetos e a implantação de estratégias usando entomopatógenos em campo, requer a diminuição dos fatores prejudiciais ao seu desenvolvimento. A colonização do fungo em plantas é uma opção interessante para viabilizar a utilização dos fungos entomopatogênicos e potencializar a proteção ao fungo (Vega, 2008).

A inoculação de fungos entomopatogênicos em plantas, de modo que o entomopatógeno se estabeleça como endofítico, protege a planta contra pragas, e também protege o fungo contra fatores abióticos (Greenfield et al., 2016). Portanto, o uso de fungos entomopatogênicos endofíticos é um método inovador, e seu uso em plantas de tomate apresenta potencial de diminuir as perdas causadas por insetos (Klieber e Reineke, 2016; Jaber e Araj, 2018).

Desta forma, a colonização de fungos entomopatogênicos como endofíticos na cultura do tomate, apresenta potencial para solucionar os problemas encontrados ao inserir os fungos diretamente no meio ambiente. Alguns dos problemas que podem ser solucionados são: pulverização direta em folhas, afetada por fatores ambientais como radiação ultravioleta e; baixa umidade e alto índice de chuvas, os quais podem diminuir a eficiência dos patógenos.

Os fungos entomopatogênicos, como *Beauveria bassiana*, apresentam um importante papel na proteção de plantas e na regulação de populações de insetos-praga. A utilização de diferentes estratégias de manejo de pragas é

fundamental para se traçar um plano de ação contra o possível ataque de insetos (Jackson et al., 2010).

O trabalho aqui apresentado mostra uma proposta de redução de ataque de pragas, a partir da inoculação de fungos entomopatogênicos na forma endofítica em plantas de tomate para controle de *T. absoluta*. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o uso de fungos entomopatogênicos da espécie *Beauveria bassiana* como fungo endofítico em plantas de tomate *Solanum lycopersicum*, visando uma nova estratégia de controle de *T. absoluta*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura do tomate

Entre as hortaliças de maior importância econômica, o tomate se destaca em relação ao volume de cultura que é produzido e a sua ampla utilização. O tomate pode ser direcionado para o consumo direto *in natura* ou para indústria na fabricação de molhos ou extratos (Alvarenga, 2004). O cultivo de tomate foi introduzido no Brasil por imigrantes europeus no final do século XIX. Assim, pode se afirmar que o uso do tomate foi difundido pelo mundo por colonizadores europeus. Inicialmente ele foi utilizado como planta ornamental e, posteriormente, no ano de 1554, o tomate foi introduzido na utilização da população (Veiga, 2014).

O tomate é cultivado no Brasil ao longo de todo o ano, porém, no período mais quente do ano sua produtividade diminui, e como consequência há aumento de preços. Essas oscilações no nível de produção e de preço estão associadas à presença de insetos-praga e doenças, que ocasionam excessivas perdas e elevam os custos de produção. Deste modo, o custo para a produção de tomate tem seu preço elevado nos períodos em que ocorre necessidade de empregar medidas de controle, como uso de inseticidas de forma maciça (Picanço e Guedes, 1999; Picanço et al., 2004).

A ocorrência de pragas e doenças na cultura do tomate influenciam principalmente a qualidade do produto final. Nas regiões tropicais e subtropicais

as pragas de maior preocupação são a mosca-branca e a traça-do-tomateiro (Melo e Vilela; 2005).

2.2. *Tuta absoluta*

A traça-do-tomateiro, *T. absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), foi descrita em 1917 por Meyrick como *Phthorimaea absoluta*, a partir de indivíduos coletados em Huancayo (Peru). Posteriormente, a praga foi referida como *Gnorimoschema absoluta*, *Scrobipalpula absoluta* (Povolny) ou *Scrobipalpuloides absoluta* (Povolny). Em 1994, a espécie recebeu a nomenclatura de *Tuta absoluta* por Povolny (Clarke, 1962; Barrientos et al., 1998; Desneux, 2010).

Desde 1979, o Brasil é o maior produtor de tomate da América do Sul, desde 1979 (Guedes e Picanço, 2012). Entretanto, em 1980, *T. absoluta* foi encontrada pela primeira vez no país (Morais e Normanha, 1982; Coelho e França, 1987). A partir desse primeiro relato, novas ocorrências de *T. absoluta* tem sido divulgada em diversas regiões produtoras de tomate no Brasil, possivelmente devido ao fluxo de comercialização de frutos infestados de um local para o outro. (Bacci, 2006; Gontijo et al., 2013).

As larvas de *T. absoluta* causam lesões diretas aos frutos e flores, danificam as hastes, os ponteiros, e minam as folhas, causando perdas significativas na produção, tornando os frutos impróprios ao consumo, ou com baixa adaptabilidade ao comércio. Essa praga é altamente nociva e sua população cresce rapidamente, causando sérios danos à cultura do tomateiro.

Nesse contexto, *T. absoluta* é uma praga que afeta gravemente a produção mundial de tomate (Santana et al., 2019). Na ausência de estratégias de controle de *T. absoluta*, as perdas causadas aos frutos podem chegar 100%. As larvas causam estragos nas folhas, quando se alimentam do mesofilo, pois a expansão das minas feitas pelas lagartas afeta a capacidade fotossintética da planta, reduzindo o rendimento e afetando a colheita de tomate (Desneux et al., 2011).

O ciclo de vida de *T. absoluta* apresenta quatro estágios de desenvolvimento, sendo estes: ovo, larva, pupa e adulto. As fêmeas normalmente realizam ovoposição na parte inferior de folhas e caules. Logo após a eclosão dos ovos, as larvas adentram frutos, caules e folhas. O estágio larval de *T. absoluta*

dura cerca de 14 dias. Ao final desta fase as larvas realizam pupação, e após cerca de 20 dias emergem os adultos (Desneux et al., 2010). Os adultos de *T. absoluta* têm hábito noturno, mantendo-se abrigados durante o dia. Entre as diferentes solanáceas, o tomate é relatado como a principal planta hospedeira de *T. absoluta* (Desneux et al., 2010). No decorrer do desenvolvimento de plantas de tomate, *T. absoluta* apresenta mais de um ciclo de vida, acarretando danos em todas as fases da cultura, especialmente na fase reprodutiva, em que causam danos diretos e indiretos nos frutos (Uchoa-Fernandes et al., 1995).

De modo geral, o controle da traça-do-tomateiro tem sido realizado por meio de múltiplas aplicações de inseticidas. Porém, o uso excessivo do controle químico pode causar efeitos maléficos ao meio ambiente, prejudicando os inimigos naturais, como predadores, parasitoides e patógenos, pode elevar as chances de seleção de populações de pragas resistentes aos inseticidas, e ainda aumentar os custos de produção (Guedes et al., 2019). Por isso, vale ressaltar que os danos causados por *T. absoluta*, resultou no aumento do uso de inseticidas, e no número de pulverizações na cultura do tomate (Guedes e Picanço; 2012).

Assim, os danos causados por *Tuta absoluta* têm afetado cerca de 60% de plantações de tomate em todo mundo. Relatos de cálculos realizados nos últimos 10 anos indicam uma disseminação com raio de 800 km por ano. Com a rápida disseminação, este inseto tem ganhado destaque como praga no cenário agrícola mundial na produção de tomate (Campos et al., 2017; Sankarganesh et al., 2017; Santana et al., 2019). De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2019), os grupos químicos registrados no Brasil para o controle da traça-do-tomateiro são: Avermectina, piretroide, benzoiluréia, semicarbazone, antranilamida, oxadiazina, tetranortriterpenóide, diamida do ácido ftálico, tiocarbamato, diacilhidrazina, espinosina, antranilamida, neonicotinóide, organofosforado e oxadiazina.

2.3. Controle biológico com fungos entomopatogênicos

O controle biológico é definido como a ação de parasitoides, predadores e patógenos na manutenção da densidade populacional de outros organismos, a um nível mais baixo do que normalmente ocorreria na sua ausência (DeBach,

1968). Portanto, o controle biológico ocorre como um fenômeno natural, em que há regulação do número de alguns organismos por ação de inimigos naturais, os quais são considerados agentes bióticos de mortalidade. O controle abrange os mecanismos da densidade recíproca, onde um ser vivo é sempre explorado por outro ser vivo, regulando o crescimento populacional (Bueno et al., 2015).

Os agentes de controle biológico, ou inimigos naturais, possuem papel importante nos agroecossistemas, pois seus componentes têm a capacidade de reduzir perdas ocasionadas por ataques de pragas. Salienta-se que o controle biológico utiliza técnicas sustentáveis e ambientalmente seguras (Bacci et al., 2018).

Entre os organismos entomopatogênicos empregados no controle microbiano, os fungos são eficientes no controle de insetos (Alves, 1998). Esses patógenos têm capacidade de infectar todos os estágios de desenvolvimento dos hospedeiros. Essa é uma característica que difere o fungo de outros organismos como as bactérias, os nematoides e o vírus (Alves, 1998). Os propágulos fúngicos empregados em programas de controle microbiano, geralmente estão na forma de conídios.

Os conídios entram em contato com um hospedeiro suscetível e, em condições adequadas de temperatura e umidade, ocorre penetração no inseto através de cutícula, e os fungos colonizarão o hospedeiro (Lacey et al., 2015). Os insetos podem ser infectados por meio do contato, ao caminhar pelas partes das plantas ou pelo consumo de tecidos vegetais contendo esporos. Os insetos infectados pelo fungo podem cessar sua alimentação e movimentação, até que ocorra a morte. Eles podem morrer em posição ereta, presos as folhas ou ramos, e em locais mais altos. Após a morte, o inseto pode apresentar consistência emborrachada, aparência oca ou permanecer firme. As hifas emergem do corpo dos insetos, e produzem esporos que podem ser espalhados pelo vento, chuva ou por meio do contato com outros insetos, causando epizootias (Mora et al., 2016).

Os principais fungos entomopatogênicos empregados em programas de controle biológico no Brasil são *Metarhizium anisopliae* (Metschn) (Hypocreales, Ascomycota) e *Beauveria bassiana* (Balsamo) (Hypocreales, Ascomycota) (Lacey, 2012). Estes patógenos podem causar morte de insetos de diferentes ordens, sendo as principais: Lepidóptera, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera e Diptera. Para que o controle seja bem-sucedido é fundamental utilizar isolados que sejam

virulentos contra o inseto-alvo. Condições adequadas de umidade e temperatura são necessárias para propiciar a infecção com as epizootias naturais mais comuns, que normalmente ocorrem durante períodos quentes e úmidos (Alves, 1998).

Diversas pesquisas têm buscado como objetivo intensificar o uso de *B. bassiana* em programas de controle biológico de insetos na agricultura e silvicultura. Para isso se faz necessário avaliar os conhecimentos sobre a atuação de diferentes isolados de *B. bassiana*, em diferentes agroecossistemas, levando em consideração as condições ambientais e suas consequências, confirmando assim, que a análise das práticas agrícolas é indispensável em programas de controle biológico (Meyling e Eilenberg, 2007).

2.4. Uso de Fungos Entomopatogênicos no controle de *T. absoluta*

Com base em estudos sobre fungos entomopatogênicos no controle de pragas agrícolas, é importante ressaltar o progresso de seu uso contra diversos insetos-praga, assim como em *T. absoluta*. Avaliações de patogenicidade elaboradas por Giustolin et al. (2001) com *B. bassiana* em *T. absoluta*, realizadas em todo o período de desenvolvimento larval, resultaram na mortalidade de todos os instares, porém, o efeito letal em larvas recém eclodidas foi mais elevado do que a mortalidade de 4º instar. O resultado pode estar relacionado à maior suscetibilidade das lagartas mais jovens, e ao maior tempo de exposição aos conídios, já que as larvas jovens da traça-do-tomateiro, raspam a folha durante 20 a 45 minutos, antes de penetrar no mesofilo (Coelho e França 1987; Giustolin et al., 2001).

Nos ensaios realizados por Pires et al. (2010), a patogenicidade de diferentes isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, testados contra ovos e larvas de *T. absoluta*, indicou a virulência dos fungos testados, mas com variações entre isolados. O controle de *T. absoluta*, em diferentes estágios de desenvolvimento, é importante, pois pode impedir a incidência de maiores danos à cultura (Pires et al., 2010).

Os efeitos da aplicação de *B. bassiana* contra larvas de *T. absoluta* apresentaram resultados eficientes (Urbaneja et al., 2012). O fungo entomopatogênico *Aspergillus oryzae*, isolado de larvas de *T. absoluta* infectadas

naturalmente no campo, foram testados em larvas, pupas e adultos de *T. absoluta*, e apresentou efeitos de mortalidade larval, inibição de pupação e redução do tempo de vida de insetos adultos. Este resultado demonstra o potencial de controle em diferentes fases do ciclo de vida do inseto, um ponto importante a ser considerado na implantação desses patógenos no controle ou manejo em um agroecossistema (Zekeya et al., 2019).

2.5. Fungos entomopatogênicos endofíticos

A expressão “endófito” foi mencionada por De Bary (1884), e é usada para definir microrganismos que são encontrados dentro de tecidos vegetais de forma assintomática. Vários gêneros de fungos entomopatogênicos foram isolados como endófitos em plantas, e alguns foram descritos como endófitos de ocorrência natural (Vega, 2018). Os fungos entomopatogênicos podem ser inoculados em plantas, e se estabelecer como endofíticos, apresentando assim, possibilidades para sua utilização em programas de controle biológico (Vega, 2008).

Apesar dos progressos em pesquisas, a aplicação dos fungos em campo apresenta desafios fundamentais que reduzem, ou inviabilizam, a sua utilização e comercialização. Estes desafios estão relacionados às condições ambientais de umidade e radiação ultravioleta dos agroecossistemas na qual os fungos são utilizados (Vega, 2008). A associação do fungo entomopatogênico, na forma endofítico em plantas, pode proteger esses patógenos das condições ambientais, fornecendo maior proteção contra os raios ultravioleta e eliminando a limitação de umidade requerida para desenvolvimento do fungo (Vega, 2018).

A presença do fungo entomopatogênico no interior da planta pode ser benéfica no controle biológico de pragas específicas, cujos ciclos de vida apresentem hábito de perfurar e se alimentar no interior das folhas, caules, rizomas, raízes e sementes, que são exatamente os fatores que restringem a eficiência de inseticidas químicos e outros métodos de controle (Resquín-Romero et al., 2016).

As plantas que contêm entomopatógenos na forma endofítica podem causar uma diminuição na performance de pragas, pois a presença do patógeno atua como agente causador de antibiose na alimentação de insetos (Vega et al., 2008). Experimentos anteriores indicaram redução da perfuração de *Ostrinia*

nubilalis (Lepidoptera; Crambidae) em plantas de milho com *B. bassiana* endofítico (Bing e Lewis, 1991; Vega, 2008). De forma semelhante, a broca do milho *Sesamia calamistis* diminui o ataque as plantas de milho com presença de fungos *B. bassiana* estabelecidos como endofíticos (Cherry et al., 2004). Os estudos na cultura do milho indicaram que o estabelecimento de *Beauveria* sp. nas plantas pode atribuir proteção sistêmica contra insetos desfolhadores (Bing e Lewis, 1992; Resquín-Romero et al., 2016).

A colonização endofítica foi relatada de forma temporária em plantas de alfafa, melão e tomate, quando foram utilizadas metodologias de aplicação, por meio de pulverização foliar, dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium brunneum* (Ascomycota; Hypocreales) e *B. bassiana*. Os fungos se estabeleceram como endofíticos por até 96 horas após a inoculação. A metodologia de pulverização permitiu ocorrência da colonização nas partes das raízes, caules e folhas. As plantas colonizadas pelos fungos foram utilizadas em bioensaios e causaram mortalidade em larvas de *Spodoptera littoralis* (Resquín -Romero et al., 2016).

A colonização de fungos entomopatogênicos na forma endofítica, a longo e curto prazo, pode auxiliar na proteção contínua e temporária de plantas. Os fungos *B. bassiana* e *M. brunneum*, também foram relatados como endofíticos em pimentão *Capsicum annum*, se estabelecendo por até 17 dias após inoculação (Jaber e Araj, 2018). A associação endofítica foi analisada utilizando diferentes linhagens de *Beauveria brongniartii* e *M. brunneum* em plantas de *Vicia faba*, inoculadas por meio de pulverização foliar, apresentando eficiência na colonização de plantas por até 14 dias após a inoculação (Jaber e Enkerli, 2017).

O potencial endofítico de *Lecanicillium lecanii*, *B. bassiana* e *Aspergillus parasiticus* foi avaliado nos cultivares de algodão (var. Sicala V2), trigo (*Triticum aestivum* L. var. Morocco), feijão (*Phaseolus vulgaris* L. var. Coles prolific), milho (*Zea mays* L. var. Doce de mel), tomate (*Lycopersicum esculentum* L. var. Grosse lisse) e abóbora (*Cucurbita máxima* L. var. Queens-land blue). Nesse caso, a colonização endofítica das plantas foi eficiente, foram usados métodos de imersão de sementes e pulverização foliar (Gurulingappa et al., 2010). Os procedimentos de inoculação artificial de fungos entomopatogênicos em plantas pode ser via pulverização foliar, injeção através do caule, irrigação do solo e tratamento de

sementes com suspensões de conídios (Bing e Lewis, 1992, Quesada-Moraga et al., 2006).

A eficiência da colonização de plantas apresenta diferenças entre espécies vegetais, isso pode ocorrer devido ao genótipo da planta hospedeira. Este é um fator determinante para a inoculação e persistência do fungo na planta. É fundamental o estabelecimento de uma associação compatível entre a planta e o endófito. Para compreender os mecanismos adotados pelos fungos entomopatogênicos na forma endofítica, é importante compreender as suas principais portas de entrada nos tecidos vegetais, e sua distribuição na planta (Quesada-Moraga et al., 2014; Resquín-Romero et al., 2016).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem dos fungos utilizados

Nos bioensaios foram utilizados os isolados LEF140, LEF141 e LPP139 de *B. bassiana*. Os isolados LEF140 e LEF141 foram coletados na Fazenda Coqueiro, na localidade de Serra das Almas, pertencente ao município de Trajano de Moraes, região serrana do estado do Rio de Janeiro.

Os fungos foram encontrados infectando insetos adultos de *Pachymerus* sp. (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). O isolado LPP139, obtido da coleção do laboratório, foi inicialmente coletado no sítio São José em Barra Alegre, distrito de Bom Jardim no estado do Rio de Janeiro. Este isolado foi encontrado infectando adultos da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera; Scolytidae).

3.2. Criação de *T. absoluta*

A criação de *T. absoluta* seguiu os métodos propostos por Leite (1998) e Silva (2011). Os indivíduos da traça-do-tomateiro foram coletados a campo, em plantações de tomate, na municipalidade de São Fidelis, estado do Rio de Janeiro. A criação foi mantida em laboratório sob temperatura de 25 °C, com umidade relativa do ar entre 75 ± 5%, e fotofase de 12h.

Os insetos foram criados em quatro gaiolas (Figura 1) de plástico (altura: 38 cm, e diâmetro: 19 cm), adaptadas para a criação, com cobertura de organza.

Foi destinada uma gaiola para oviposição, uma para larvas de primeiro e segundo instar, uma terceira para larvas de terceiro e quarto instar, e a quarta gaiola foi para a pupação e emergência de adultos.



Figura 1. Gaiolas utilizadas na criação de *T. absoluta*.

As larvas foram alimentadas diariamente com folhas de tomate de plantas do cultivar Santa Clara, oriundas de plantas da casa de vegetação da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, mantidas sobre a condição de 25 a 40 °C de temperatura, com umidade de aproximadamente 50% e fotoperíodo natural, sem aplicação inseticida.

3.3. Preparo das suspensões fúngicas

Os fungos foram cultivados no laboratório em meio de cultura SDA (Agar Sabouraud Dextrose), para promover o crescimento massal de conídios de *B. bassiana*. Após crescimento no meio, os conídios foram transferidos para 200 gramas de arroz parboilizado estéril e 50 mL de água destilada, colocados em frasco Erlenmeyer de 250 mL.

Foi adicionado 1mL⁻¹ de suspensão do fungo na concentração de 1x 10⁸ conídios por mL⁻¹, após a inoculação do fungo, os mesmos foram mantidos em câmara tipo BOD, a uma temperatura de 27 °C e fotoperíodo de 12L:12E, durante 7 dias, para estimular o crescimento e germinação. Posteriormente os fracos foram transferidos para geladeira, onde foram mantidos até a utilização nos ensaios.

3.4. Teste de patogenicidade de diferentes isolados de *Beauveria* em larvas de *T. absoluta*

Os testes de patogenicidade e virulência foram realizados utilizando os isolados LPP139, LEF140 e LEF141 de *B. bassiana*, do laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF) da UENF. Cada tratamento foi realizado com um isolado de *B. bassiana*. Foram usadas 50 larvas de 1º e 2º instar de *T. absoluta* para cada repetição e para o controle. Os conídios dos fungos foram suspensos em Tween 20 a 0,01% (v/v), e a concentração foi estimada utilizando um hemocitômetro Neubauer. Para obter a concentração final de 1×10^8 conídios por mL, foram feitas diluições seriadas.

Foram utilizados folíolos de planta de tomate *S. lycopersicum* do cultivar Santa Clara, com cerca de 30 a 40 dias de idade, os quais, em campo, são naturalmente atacados por *T. absoluta*. Estes folíolos foram esterilizados em hipoclorito de sódio a 0.5% por 2 minutos, etanol 70% por 2 minutos e, na sequência, foram lavados 3 vezes em água destilada estéril, a fim de garantir que nenhum outro agente externo na folha pudesse interferir na sobrevivência das larvas. Em seguida os folíolos foram imersos durante 30 segundos na suspensão fúngica, deixados secar naturalmente, e ofertados às larvas de *T. absoluta*.

No controle foi utilizado Tween 20 a 0,01% (v/v). A sobrevivência das larvas foi avaliada diariamente, por um período de 10 dias. A cada dois dias foi adicionado um novo folíolo de tomateiro sem tratamento para alimentação das larvas, sendo estes previamente limpos como descrito no procedimento acima. Os experimentos foram realizados a uma temperatura de 25–27 °C, umidade relativa de 50–70% e fotoperíodo de 12L: 12D. Todos os testes foram realizados três vezes. O teste Log-rank (Mantel-Cox) foi usado para análise de comparação da curva de sobrevivência, e a análise de Kaplan-Meier para o cálculo do tempo médio de sobrevivência (S_{50}) (*software GraphPad Prism*).

3.5. Colonização de plantas de tomate com fungos entomopatogênicos

As plantas de tomate foram cultivadas a partir de sementes, variedade “tomate italiano” de Topseed Ltda., (São Paulo, Brasil), utilizando substrato de planta comercial em condições de casa de vegetação: turfa, casca de pinheiro, vermiculita, enriquecido com macro e micronutrientes, fornecidos pela Mogifertil Flores Ltda. (São Paulo, Brasil).

As sementes foram certificadas como livres de fungicidas e inseticidas pelo fabricante. Antes do uso, o substrato foi autoclavado duas vezes por 30 minutos, durante dois dias consecutivos. Quando as plantas começaram a produzir grande número de folhas (aproximadamente 1 mês após a semeadura), caules com folhas foram retirados dos tomateiro principal, e submetidos a estresse hídrico por 4 horas (sem água), com o objetivo de estimular a absorção dos fungos (Figura 2A e 2B). Após esse tratamento, as hastes destacadas com folhas foram colocadas em béquer de ensaio contendo suspensões de conídios (1×10^8 conídios mL^{-1}) de cada isolado (LEF140, LEF141 e LPP139). As hastes destacadas do controle com folhas foram colocadas em Tween 20 (0,01% v / v). Todas as hastes destacadas foram mantidas nas suspensões por 24 horas. Cinco hastes destacadas com folhas foram utilizadas para cada tratamento e para o grupo controle.

A colonização das folhas foi avaliada após 24 horas de exposição à suspensão fúngica. Primeiramente, as folhas foram esterilizadas superficialmente por imersão em hipoclorito de sódio a 0,5% por 2 min, etanol 70% por 2 min e, em seguida, as folhas foram enxaguadas 3 vezes em água destilada estéril. As folhas destacadas das hastes foram então cortadas em pequenos fragmentos (aproximadamente 0,5 cm de comprimento), usando uma lâmina de dissecação estéril. Os fragmentos das folhas foram colocados em placas de Petri contendo SDA e incubados a 27 °C 12L:12D por 7 dias, para avaliar a ocorrência de colonização das plantas e para o reisolamento dos fungos.



Figura 2 A. Ramos de tomate sofrendo estresse hídrico. B. Ramos de tomate após 24 horas na suspensão.

A partir do momento que o desenvolvimento de fungos foi observado na interface do tecido da planta com a superfície do meio de cultura, as estruturas dos fungos foram reisolados em meio SDA fresco, e cultivadas até o aparecimento de conidióforos, que foram usados para identificação morfológica do gênero (Lacey, 2012). Os fungos reisolados, confirmados como *B. bassiana*, foram cultivados em arroz (como descrito acima) por 7 dias, a fim de produzir grandes quantidades de conídios para uso no experimento seguinte de inoculação de plântulas de tomate.

3.6. Inoculação de Plântulas de tomate

A colonização de *Solanum lycopersicum* foi realizada inoculando plântulas com conídios de *B. bassiana* isolado LPP139. Os conídios do fungo reisolado das plantas no experimento anterior (3.5), e crescidos em arroz, foram utilizados para inoculação de plântulas de tomate. O experimento foi realizado adotando delineamento inteiramente casualizado.

As sementes foram esterilizadas em hipoclorito de sódio a 0.5% por 2 minutos, em etanol 70% por 2 minutos, e lavadas 3 vezes em água destilada estéril. Foi retirada uma alíquota de 20 μ L da última água de lavagem, a qual foi

colocada em meio de cultura SDA e deixada em BOD durante 7 dias, para verificar a eficiência da esterilização.

Após o procedimento de esterilização, as sementes foram colocadas em placas de Petri forradas com papel filtro autoclavado, umedecidas com 1mL de água destilada estéril, e deixadas em câmara úmida (100% UR) por 6 dias, para estimular a germinação. Após esse período, foi adicionado 1mL da suspensão de conídios do isolado LPP139 na concentração de 1×10^8 conídios por mL^{-1} . Subsequente à inoculação, as plântulas foram deixadas em câmara úmida por 2 dias e, em seguida, foi realizado plantio em copos plásticos de 50 mL, contendo 50 gramas de substrato esterilizado, como descrito anteriormente.

Para cada experimento foram destinadas quarenta plantas, 20 mudas tratadas com fungo e 20 mudas para o controle. As plantas foram avaliadas quanto à presença ou ausência de *B. bassiana* aos 7 dias pós-inoculação (DPI), 14 DPI, 21 DPI e 30 DPI. Todas as plantas foram cultivadas em câmara de crescimento Fitotron a 27 °C, e fotoperíodo de 12hL:12hD. Antes do seccionamento, as plantas foram esterilizadas em superfície, conforme descrito anteriormente.

Para cada planta, foram avaliadas 3 partes, raiz, caule e folha, quanto à presença de fungos endofíticos. Para cada período (DPI), cinco pedaços de 0,5 cm de cada parte da planta foram colocados em placas de Petri com meio de cultura SDA. As seções foram contabilizadas quanto à presença ou ausência de fungos após uma incubação de 7 dias a 27 °C, por observação visual, usando um estereomicroscópio. Os dados foram apresentados como a porcentagem média de cada seção da planta com a presença do fungo por cada tempo DPI. O experimento foi realizado três vezes.

3.7. Bioensaios de efeitos das plantas colonizadas com fungo em *T. absoluta*

As folhas de tomateiro colonizadas com *B. bassiana*, conforme descrito anteriormente, foram oferecidas às larvas de *T. absoluta*. As folhas foram removidas das plantas a 30 DPI, período em que o experimento anterior havia confirmado 100% de colonização. Em seguida, as folhas foram colocadas em placas de Petri de 9 cm, e dez larvas de 2º ou 3 instar foram cuidadosamente transferidas para as folhas em cada placa de Petri. A taxa de sobrevivência de 50

larvas foi avaliada diariamente, durante 7 dias, e folhas frescas (não tratadas com fungo) foram colocadas para alimentação nas placas de Petri a cada 2 dias.

As larvas mortas foram removidas diariamente e colocadas em pratos com papel filtro umedecido para avaliação da conidiogênese. A mesma metodologia foi utilizada para as plantas do grupo controle. Os dados da taxa de sobrevivência dos insetos foram analisados usando o programa estatístico *GraphPad Prism 7*, como indicado anteriormente. O experimento foi realizado duas vezes. As larvas do grupo controle receberam folhas não tratadas com fungos.

3.8. Avaliação de parâmetros agronômicos

Com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos da colonização fúngica no desenvolvimento das plantas, cinco tomateiros foram escolhidos de forma aleatória para a medição dos seguintes parâmetros: diâmetro do caule (mm; com Vernier caliper); altura da planta (cm; usando uma régua de aço), e; contagem de número de folhas.

Esses parâmetros foram estimados em 20, 25 e 30 DPI. Cinco plantas de controle também foram monitoradas durante os mesmos períodos de tempo. Os valores médios para os dados de crescimento da planta foram analisados para diferenças estatísticas usando ANOVA de uma via (*software* SPSS). Este experimento foi realizado duas vezes, para plantas tratadas e controle, com um total de 20 plantas avaliadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teste de patogenicidade utilizando três isolados de *B. bassiana* em larvas de *T. absoluta*

Foi constatado que todos os isolados de *B. bassiana* testados no presente estudo apresentaram patogenicidade às larvas de *T. absoluta* de 2º e 3º instar, após o contato dos insetos com folhas que haviam sido tratadas com suspensões fúngicas. Ocorreram algumas diferenças na virulência ao comparar os isolados, ainda que não tenham sido significativas. As comparações da curva Log-Rank para todos os dados de sobrevivência resultaram na equação X^2 (df = 3) = 97,06 P <0,0001), que demonstra que os grupos de isolados tratados foram significativamente diferentes dos controles.

Embora cada isolado tenha diferentes valores de S_{50} (tempo médio de sobrevivência em quantidade de dias), eles não apresentaram diferenças estatísticas entre as curvas de sobrevivência (X^2 (df = 2) = 5,29; P = 0,071). O isolado mais virulento foi LEF141, que demonstrou um valor S_{50} de 6 dias, enquanto LEF140 obteve a S_{50} de 7 dias. A virulência mais baixa foi observada ao testar LPP139, que exibiu S_{50} de 8 dias.

No entanto, ressalta-se que a taxa de sobrevivência percentual final, após 10 dias, foi semelhante para todos os três isolados, com aproximadamente 10% das larvas permanecendo vivas no final do experimento (Figura 3).

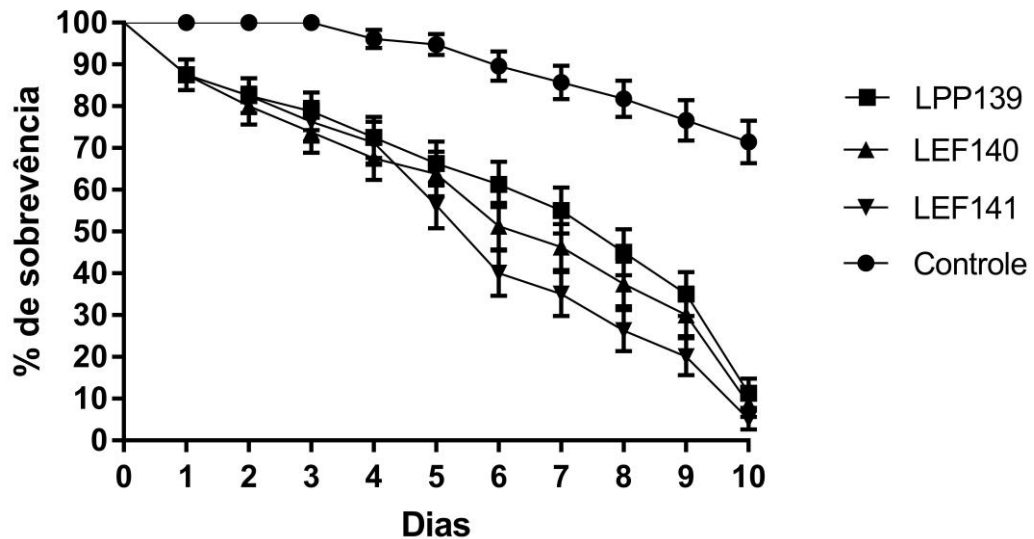


Figura 3. Curvas de sobrevivência de larvas de *T. absoluta* após exposição a conídios de *B. bassiana* (LPP 139; LEF 140; LEF 141) em folhas de tomateiro. Os resultados foram as médias de três repetições por isolado. Cinquenta insetos foram usados por experimento e por isolado. As folhas do grupo controle foram tratadas apenas com Tween 20 (0,01% v / v).

A taxa de sobrevivência do grupo controle, após 10 dias, foi de 71%. Todos os três isolados foram utilizados no experimento seguinte. A conidiogênese foi observada em 90% dos cadáveres de insetos expostos ao fungo. Nenhuma conidiogênese foi observada nos controles.

4.2. Colonização artificial de *B. bassiana* em tomateiros.

Os ensaios preliminares, utilizando as quatro técnicas de colonização relatadas, não tiveram sucesso, por isso os métodos e resultados não foram apresentados neste estudo. Descrições detalhadas das técnicas padrão são relatadas na revisão de Vega (2018). O encharcamento das raízes, o tratamento de sementes, a injeção no caule e a aplicação foliar de *B. bassiana* não resultaram na colonização do tecido vegetal, conforme determinado por plaqueamento de seções de material vegetal das raízes, caules ou folhas, em diferentes momentos após a inoculação do fungo. A única técnica que apresentou resultados positivos para um dos isolados foi a de “estresse hídrico”, conforme

descrito anteriormente. Com essa técnica foi possível isolar novamente *B. bassiana* LPP139 das folhas de plantas tratadas com o fungo.

O fungo *B. bassiana* foi identificado por meio de análise das características morfológica do conidióforo, fiálides e conídios de formato arredondados, característicos do gênero (Lacey, 2012). Nas plantas controle não foram encontrados nenhum fungo com características de *B. bassiana*. Portanto, o isolado LPP139, que foi reisolado de tomateiros, foi utilizado nos experimentos seguintes.

Os fungos entomopatogênicos endofíticos podem colonizar várias espécies de plantas, fornecendo proteção natural contra insetos herbívoros. Estes fungos também podem ser inoculados artificialmente em plantas, essa opção tem importantes aplicações para a proteção de culturas, a espécie mais empregada em tais estudos tem sido *B. bassiana* (Vega, 2018).

Muitas técnicas podem ser utilizadas para inoculação artificial de plantas com fungos entomopatogênicos. Muitas dessas estratégias foram revisadas por McKinnon et al. (2017) e Vega (2018). Algumas metodologias podem ser eficazes para certas espécies de plantas, enquanto para outras espécies não apresentam eficácia. Os métodos convencionais descritos na literatura, inicialmente testados no presente estudo, para inocular artificialmente plantas de tomate com *B. bassiana*, tais como imersão de folhas, encharcamento do solo/raiz e injeção direta de suspensões fúngicas nas hastes, não resultaram em colonização endofítica.

O primeiro resultado positivo de colonização endofítica foi obtido estressando as plantas de tomate e colocando as hastes destacadas com folhas em suspensões de *B. bassiana*. No entanto, apenas um dos três isolados aqui utilizados (LPP139), foi subseqüentemente reisolado dos tecidos das folhas. Salienta-se que poucos estudos são realizados a fim de para comparar as propriedades endofíticas de diferentes isolados da mesma espécie de fungo (McKinnon et al., 2017; Vega, 2018).

A colonização endofítica por *B. bassiana* pode ser influenciada não apenas pelos métodos de inoculação utilizados, mas também pelos isolados de fungos ou espécies de plantas (Posada et al., 2007; Parsa et al., 2013). Por outro lado, *B. bassiana*, que foi identificada como um endófito natural em tomates silvestres, colonizou com mais sucesso plantas de tomate cultivadas, do que dois

isolados de *B. bassiana* no solo (Qayyum et al., 2015). Os mecanismos responsáveis por essas diferenças não foram investigados. Os resultados obtidos no presente trabalho indicaram que o LPP139 se adaptou rapidamente ao novo ambiente da planta, e foi posteriormente capaz de colonizar as plantas de tomate via inoculação de plântulas.

4.3. Colonização de plantas de tomate a partir da inoculação de plântulas.

A colonização do fungo *B. bassiana*, isolado LPP 139, inoculados nas plântulas foi eficiente, e não foram observados fungos entomopatogênicos na forma endofítica no controle. A porcentagem de colonização foi calculada de acordo com a presença (Figura 4) ou ausência de *B. bassiana* nas diferentes partes vegetais (raiz, caules e folhas), em relação ao tempo analisado.



Figura 4. Fungos emergindo do tecido vegetal colonizado por *B. bassiana*, isolado LPP139.

Os tecidos das raízes e caules apresentaram as maiores porcentagens de colonização no 7^o DPI, com 80% das amostras de tecido sendo positivas para presença de *B. bassiana*, entretanto, apenas 46% das amostras de tecido foliar foram colonizadas (Tabela 1).

No período de 14 DPI, 86% das amostras de raiz e caule apresentaram colonização endofítica, com contagens positivas para as folhas aumentando ligeiramente para 53%. Por volta de 21 DPI, todas as amostras de raízes e caules

apresentavam colonização de *B. bassiana*, com um aumento contínuo na colonização da seção foliar (66%).

Em 30 DPI, todas as amostras de tecido de todas as partes das plantas foram 100% positivas para colonização fúngica. Os resultados dos controles não são indicados na tabela, pois todas as amostras foram negativas para colonização por *B. bassiana*.

Tabela 1. Porcentagem média (\pm DP) de colonização endofítica de *B. bassiana* em mudas de tomate em dias posteriores a inoculação (DPI) via plântulas.

Partes da Planta	7 DPI	14 DPI	21 DPI	30 DPI
Raiz	80 \pm 20	86.6 \pm 11.5	100	100
Caules	66.6 \pm 11.5	86.6 \pm 11.5	100	100
Folhas	46.6 \pm 11.5	53.3 \pm 11.5	66.6 \pm 11.5	100

Embora a inoculação de plântulas seja similar à inoculação de sementes, o presente estudo verificou somente resultados de colonização através da inoculação de plântulas. Não foram identificadas nenhuma colonização endofítica de plantas por imersão de sementes em suspensões fúngicas. O tratamento de sementes com suspensões de conídios de *B. bassiana* também apresentou baixa eficiência na colonização endofítica em plantas de tabaco, milho, trigo, soja (Russo et al., 2015) e tomate (Allegrucci et al., 2017). Como alternativa, outros estudos utilizaram métodos de inoculação de sementes de tomate para colonizar plantas com sucesso (Ownley et al., 2008; Sánchez-Rodríguez et al., 2015; Shrivastava et al., 2015).

No presente estudo, a inoculação por LPP139 em plântulas resultou em uma colonização relativamente rápida e duradoura. Os resultados demonstraram colonização inicial das raízes e caules e, eventualmente, das folhas. Foi demonstrado que a imersão nas raízes de mudas de tomate é o método de inoculação mais adequado para estabelecer *B. bassiana* como endófito, com o objetivo de proteger as plantas de tomate de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Qayyum et al., 2015).

Os endófitos podem permanecer detectáveis nos tecidos das plantas por diferentes períodos de tempo, após a inoculação e colonização. No presente estudo, *B. bassiana* foi detectado por até 30 dias em todos os tecidos (raízes,

caules e folhas). Como esperado, esse parâmetro é altamente variável ao comparar diferentes estudos. Segundo Allegrucci et al. (2017), no caso de tomateiro colonizado por aplicação de suspensões fúngicas nas folhas (método mais eficiente, conforme indicado pelos autores), os maiores níveis de colonização (10%) ocorreram no dia 7. No entanto, no dia 28 o fungo era dificilmente detectável (0,5%) nas folhas.

Do mesmo modo, Gurulingappa et al. (2010) também documentaram um rápido declínio nos níveis de endófitos ao longo do tempo, em uma variedade de plantas. O declínio na porcentagem de colonização ao longo do tempo pode ser causado pela competição de outros endófitos na planta (Posada et al., 2007). Estudos de McKinnon et al. (2017), apontaram a necessidade da adoção de protocolos de esterilização mais rigorosos para quantificação da colonização endofítica, para uma maior compreensão dos mecanismos antagônicos envolvidos nas interações que ocorrem entre planta e insetos.

4.4. Bioensaios de sobrevivência de larvas de *T. absoluta* expostas a tomateiro colonizado por *B. bassiana*

Foi observado o efeito de *T. absoluta* nas larvas quando elas se alimentaram das plantas colonizadas com fungo entomopatogênico na forma endofítica. As folhas de tomateiros com 30 DPI, correspondentes as mudas tratadas e colonizadas com *B. bassiana* LPP139, foram oferecidas às larvas de *T. absoluta* de 2^o e 3^o instar.

As taxas de sobrevivência das larvas foram reduzidas, conforme demonstrado na Figura 6. Foram observadas diferenças significativas nas taxas de sobrevivência dos controles e tratamentos (Log-Rank $X^2 = 169,5$; gl 3; $P < 0,0001$). Em ambos os experimentos (Exp. 1 e Exp. 2), cujas larvas foram expostas às folhas colonizadas por LPP139, o S_{50} foi de 4 dias, e todas as larvas morreram até o 7^o dia de avaliação. Nenhuma conidiogênese foi observada em cadáveres de larvas mortas que foram expostas às folhas colonizadas por *B. bassiana*.

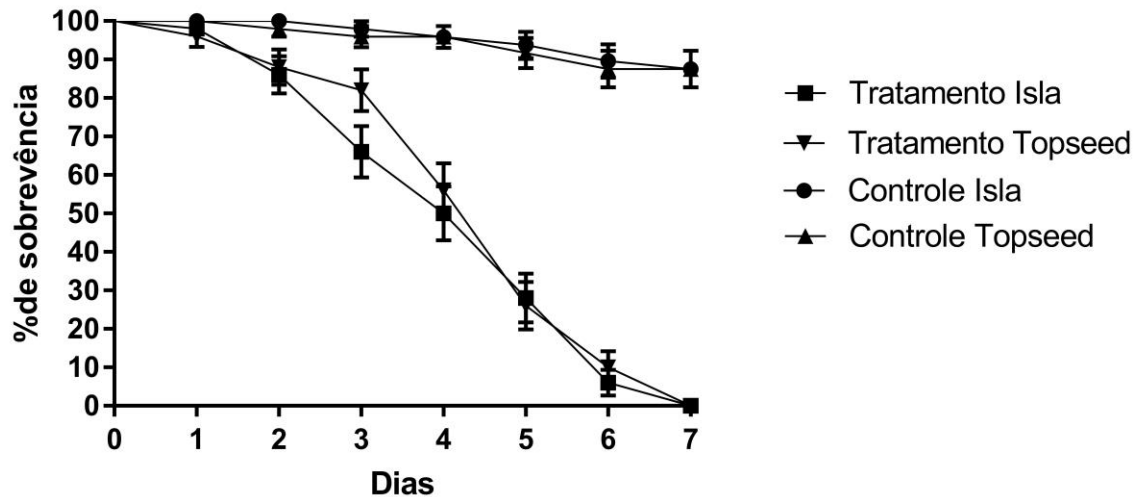


Figura 5. Sobrevivência de larvas de *T. absoluta* alimentadas com folhas de tomateiro colonizadas por *B. bassiana*.

Os resultados obtidos indicaram a redução das taxas de sobrevivência de *T. absoluta* quando folhas colonizadas foram oferecidas às larvas. As curvas de sobrevivência (Figura 5) apresentam a rápida mortalidade das larvas de *T. absoluta* durante um período de 7 dias. O fungo entomopatogênico *B. bassiana* apresentou mais eficácia em matar *T. absoluta* na forma endofítica, do que quando os conídios foram aplicados diretamente nas superfícies foliares. Isso pode ter ocorrido devido ao comportamento minador das larvas, que reduziu o tempo de exposição ao fungo aplicado na superfície das folhas no primeiro experimento.

Nesse contexto, é difícil fazer comparação entre os resultados de patogenicidade do fungo aplicado na forma convencional, com os fungos do antagonismo endofítico. As pesquisas de El-Deeb et al. (2012), identificaram que a mortalidade de moscas-brancas, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), foi mais alta quando foram oferecidas folhas de tomate colonizadas endofiticamente por *B. bassiana* (mortalidade de 90%), em comparação com as taxas de mortalidade (10%) observadas após a exposição aos fungos aplicados na superfície foliar.

Por outro lado, os estudos de Allegrucci et al. (2017) e Klieber e Reineke (2016), observaram e compararam as taxas de sobrevivência de *T. absoluta* na oferta de folhas de tomate colonizadas por *B. bassiana* endofítica, e as taxas de sobrevivência após exposição de *T. absoluta* a conídios nas folhas de tomate. Os

estudos indicaram que fungos endofíticos foram menos eficazes na redução da sobrevivência de *T. absoluta* do que os fungos aplicados diretamente nas folhas.

No presente estudo as taxas de sobrevivência larval foram reduzidas rapidamente após a exposição e alimentação com folhas de tomate colonizadas endofiticamente, quando comparadas às larvas colocadas em folhas que foram imersas em suspensões de fungos, indicando que os fungos endofíticos agem de maneira mais eficiente internamente na planta do que em sua superfície. Esse resultado pode ser interpretado de diferentes formas: o fungo pode secretar toxinas que mataram os insetos, ou o fungo estimulou a planta a produzir compostos defensivos (resistência induzida).

Os estudos acerca do modo antagônico de ação dos entomopatógenos endofíticos, demanda atenção e cautela, pois ao observar a chamada “patogênese” dos endófitos, percebe-se que estes podem não produzir propágulos infecciosos no ambiente interno da planta. Algumas possibilidades ainda precisam ser investigadas, como, por exemplo, se os fungos entomopatogênicos são capazes de produzir blastosporos durante a colonização das plantas. Os blastosporos são propágulos infecciosos que podem penetrar no tegumento do inseto, colonizando-o rapidamente, e matando seus hospedeiros (Alkhalbari et al., 2016).

Pouco se sabe sobre a atuação que os fungos entomopatogênicos endofíticos causam na inibição do desenvolvimento, repelência ou morte de insetos. Várias possibilidades foram sugeridas, e a menos provável parece ser infecção por micose (Vega, 2018). Alguns estudos demonstraram a presença de hifas fúngicas nos tecidos vegetais (Wagner e Lewis, 2000; Sakulkoo et al., 2018), no entanto, sabe-se que as hifas causam infecção, mesmo após a ingestão. A pesquisa de Leckie et al. (2008), demonstrou os efeitos tóxicos de micélios secos em larvas de *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) por ingestão. Embora tenha sido um experimento *in vitro*, é possível que a ingestão de hifas e micélios vivos possa ter efeitos negativos nos insetos herbívoros. Outra possibilidade é que as toxinas secretadas por fungos entomopatogênicos possam afetar negativamente os insetos. Fungos como *Beauveria* e *Metarhizium*, produzem uma variedade de compostos tóxicos, incluindo os peptídeos cíclicos beauvericin, bassianolide e destruxin (Strasser et al., 2000; Wang e Xu, 2012; Golo et al., 2014).

As toxinas fúngicas desempenham um papel importante no processo de patogenicidade, durante a infecção do inseto hospedeiro (Samuels et al., 1988), mas também podem ser expressas durante a colonização endofítica, protegendo as plantas dos herbívoros (Tan e Zou, 2001; Christian et al., 2020). No presente estudo não foi observada conidiogênese nos cadáveres de larvas de *T. absoluta* que se alimentaram de folhas de tomate colonizadas endofiticamente. Isso indicaria que os insetos não sucumbiram a uma infecção por fungos, mas que a morte ocorreu devido a outras causas. No entanto, não é incomum que os fungos matem seus hospedeiros sem subseqüentemente esporular nos cadáveres. A ausência de micose também foi observada em cadáveres de *S. littoralis* e *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), expostos a *M. brunneum* e *B. bassiana* que colonizaram folhas de tomate e couve-flor (Gautam et al., 2016; Resquín-Romero et al., 2016).

Um fator que pode resultar em efeitos antagônicos em insetos herbívoros é a indução de compostos de defesa de plantas, após a colonização por fungos endofíticos. Esses compostos podem ser produzidos pela planta como uma reação à infecção por fungos, resultando em um efeito colateral nas pragas de insetos (Shrivastava et al., 2015).

4.5. Avaliação de parâmetros agronômicos

Os resultados das análises dos dados agronômicos não indicaram nenhum efeito significativo no desenvolvimento da planta (diâmetro do caule, altura da planta e número de folhas) após a colonização por LPP139. As mensurações médias de crescimento de planta após colonização endofítica foram comparadas utilizando ANOVA. Aos 20 dias após a inoculação, nenhuma diferença significativa foi observada entre as plantas dos tratamentos e dos controles para: diâmetro médio do caule (cm) ($F = 0$; $P = 1$); altura (cm) ($F = 0,0204$ $P = 0,890$) e; número de folhas ($F = 2,250$ $P = 0,172$). Aos 25 dias também não houve diferenças significativas entre as plantas tratadas e controle: diâmetro do caule ($F = 2,133$ $P = 0,182$), altura ($F = 0,214$ $P = 0,656$) e número de folhas ($F = 0,0741$ $P = 0,792$). Da mesma forma, nenhuma diferença significativa foi observada aos 30 dias para o diâmetro ($F = 3,429$ $P = 0,101$), altura ($F = 0,207$ $P = 0,656$) e número de folhas ($F = 0,0741$ $P = 0,792$).

= 0,661) e número de folhas ($F = 2,104$ $P = 0,185$). Os dados são mostrados na Figura 6.

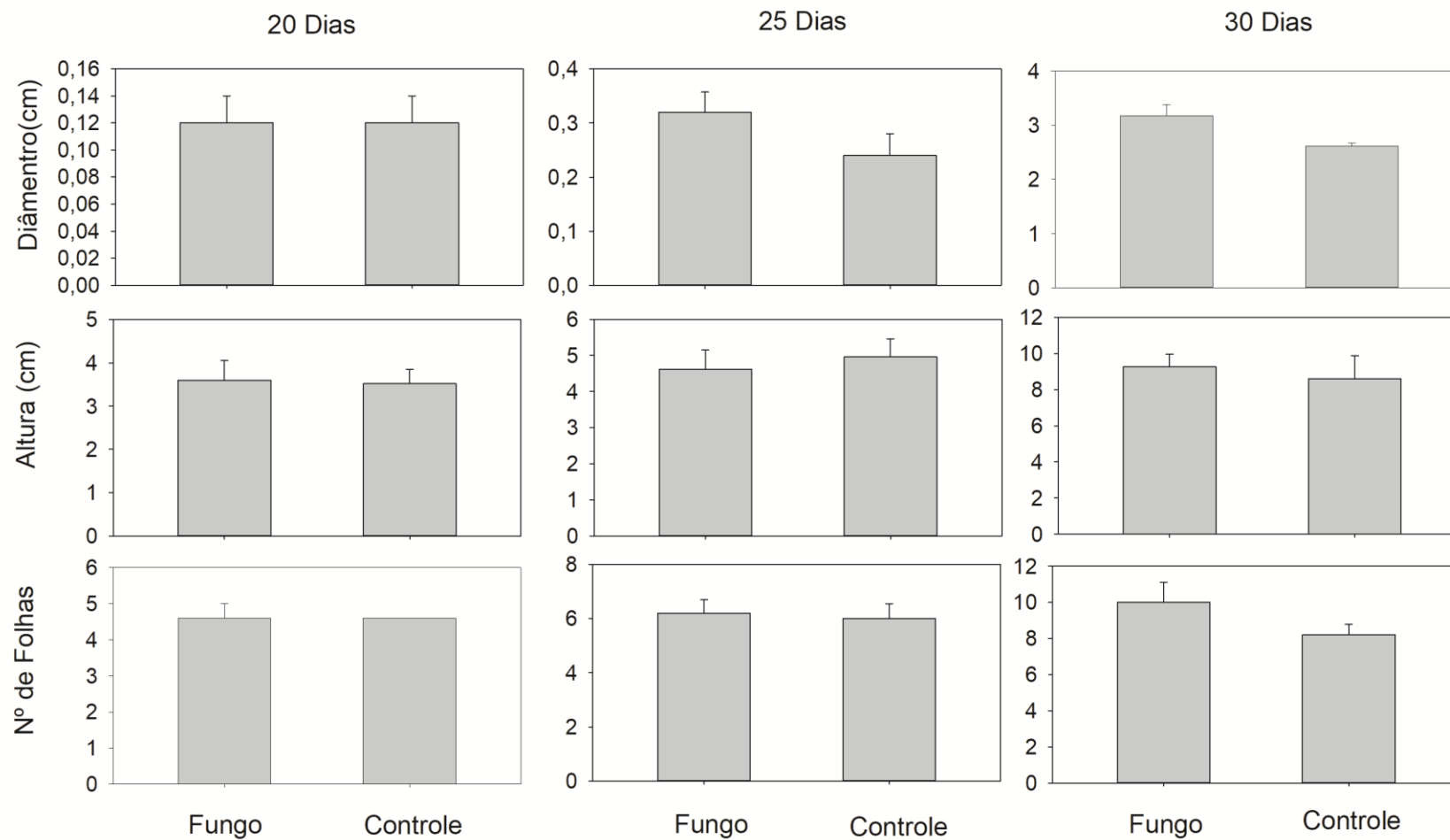


Figura 6. Dados agrônômicos de plantas da Variedade *Topseed*. Asteriscos (*) denotam diferença estatística ente os tratamentos.

Estudos indicaram que os fungos entomopatogênicos endofíticos não apresentam efeitos negativos no crescimento das plantas, entretanto, podem estimular seu crescimento (Vega, 2018). No presente estudo, o desenvolvimento da planta foi monitorado durante um período de 30 dias, após a inoculação com *B. bassiana*. Não foram verificadas diferenças no diâmetro do caule, altura das plantas e número de folhas, quando comparadas às plantas de tomateiro colonizadas endofiticamente e plantas controle. Este é um resultado importante que pode ser usado para demonstrar aos agricultores a importância de se adotar estratégias alternativas no controle de pragas.

Desta forma, afirma-se que a comercialização de plantas de tomate pré-colonizadas com *B. bassiana* é viável, dado o crescente mercado de produtos orgânicos. Estudos adicionais serão realizados para monitorar a presença de *B. bassiana* em tomateiro até o estágio em que produzem frutos. A colonização de outras variedades de tomate também será investigada.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A cultura do tomate (*Solanum lycopersicum*) é afetada por diferentes insetos-praga, como a traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta*, praga-chave de tomate, podendo ocasionar perdas de produção de até 100%. Os problemas fitossanitários relacionados a *T. absoluta*, representam uma barreira à produtividade na cultura do tomateiro. Nesse contexto, a inoculação de fungos entomopatogênicos endofítico em plantas, promove proteção à planta contra pragas, e protege o fungo contra fatores abióticos. Desse modo, o uso de fungos entomopatogênicos endofíticos é um método inovador, e seu uso em plantas de tomate pode diminuir as perdas causadas por insetos.

No presente estudo foram realizados testes de patogenicidade com três isolados de fungos entomopatogênicos (LPP139, LEF140, LEF141), aplicados na superfície das folhas, que posteriormente foram oferecidas às larvas de *T. absoluta*. Os isolados também foram utilizados para inocular plantas de tomate, com o objetivo de reisolar o fungo mais promissor na colonização endofítica da planta. Após inocular e isolar o *B. bassiana* do tomate, o fungo reisolado LPP139, foi então utilizado para inoculação em plântulas de tomate. A colonização fúngica foi avaliada aos 7, 14, 21 e 30 dias após a exposição ao fungo. As plantas colonizadas com *B. bassiana* endofítica foram utilizadas em teste de antagonismo contra larvas de *T. absoluta*. Os parâmetros agrônômicos das plantas foram avaliados, a fim de analisar possíveis efeitos do fungo na forma endofítica.

Os resultados indicaram que todos os isolados apresentaram patogenicidade a larvas de *T. absoluta*. Mas, apenas o isolado LPP139 colonizou

as plantas de tomate, sendo assim, utilizado para inoculação em plântulas. A colonização de tomateiro pela inoculação de plântulas com conídios de *B. bassiana* foi bem-sucedida, e não foram verificados entomopatógenos nos tratamentos controle.

As plantas colonizadas com *B. bassiana* endofítica foram eficientes na redução de sobrevivência de larvas de *T. absoluta*, que se alimentaram das folhas. O isolado LPP139 de *B. bassiana* colonizou de forma eficiente plantas de tomate via plântulas, e o fungo foi detectado até 30 dias após a inoculação inicial. A avaliação dos parâmetros agrônômicos não apresentou diferenças estatísticas entre tratamento e controle, não sendo verificados efeitos negativos da colonização do fungo entomopatogênico na forma endofítica. Dessa forma, conclui-se que os isolados de fungos entomopatogênicos *B. bassiana* aplicados na superfície foliar utilizados neste estudo, foram patogênicos contra larvas de *T. absoluta*.

O método de inoculação em plântulas, com o isolado LPP139 apresentou eficiência na colonização de mudas de tomate, e sua presença foi confirmada aos 7, 14, 21 e 30 dias, após sua inoculação inicial. O fungo na forma endofítica causou mortalidade às larvas de *T. absoluta*. Não foram verificados efeitos negativos no desenvolvimento das plantas colonizadas endofiticamente. Este resultado indica o potencial da metodologia descrita no presente estudo para implementação em programas de proteção de plantas, reduzindo os danos causados por insetos-praga, eliminando, assim, a necessidade de aplicações de inseticidas.

REFERÊNCIAS

- Alkhaibari, A.M., Carolino, A.T., Yavasoglu, S.I., Maffei, T., Mattoso, T.C., Bull J.C., Samuels, R.I., Butt, T.M. (2016) *Metarhizium brunneum* blastospore pathogenesis in *Aedes aegypti* larvae: attack on several fronts accelerates mortality. PLoS Pathog. 12: e1005715.
- Allegrucci, N., Velazquez, M.S., Russo, M.L., Perez, E., Scorsetti, A.C. (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). *Journal of Plant Protection Research*. 57:205–11.
- Alvarenga, M.A.R. (2004) *Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidropônica*. Lavras: UFLA. 400p.
- Alves, S.B. (1998) Fungos Entomopatogênicos. In Alves S.B., *Controle microbiano de insetos*. 2º ed. Piracicaba, Fealq, 289-381.
- Bacci, L. (2006) Factors determining the attack of *Tuta absoluta* on tomato. *Doctoral tese*, Universidade Federal de Viçosa.
- Bacci, L., Silva, É.M., Martins, J.C., Soares, M.A., Campos, M.R.D., Picanço, M.C. (2018) Seasonal variation in natural mortality factors of *Tuta absoluta*

- (Lepidoptera: Gelechiidae) in open-field tomato cultivation. *Journal of Applied Entomology*.
- Barrientos, Z.R., Apablaza, H.J., Norero, S.A., Estay, P.P. (1998) Temperatura base y constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Ciência e Investigación Agraria*, 25:133–137.
- Bing, L.A., Lewis, L.C. (1991) Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Environmental entomology*, 20:1207-1211.
- Bing, L.A., Lewis, L.C. (1992). Temporal relationships between *Zea mays*, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera, Pyralidae) and endophytic *Beauveria bassiana*. *Entomophaga*, 37:525-536.
- Bueno, A., Junior, J., Junior, A.M., Silveira, L.D. (2015) *Controle biológico e manejo de pragas na agricultura sustentável*. Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras.
- Campos, M.R., Biondi, A., Adiga, A., Guedes, R.N.C., Desneux, N. (2017) From the Western Palaearctic region to beyond: *Tuta absoluta* 10 years after invading Europe. *Journal of Pest Science*, 90:787-796.
- Cherry, A.J., Banito, A., Djegui, D., Lomer, C. (2004) 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*, 50:67-73.
- Christian, N., Sedio, B.E., Florez-Buitrago, X., Ramírez-Camejo, L.A., Rojas, E.I., Mejía, L.C., Palmedo, S., Rose, A., Schroeder, J.W., Herre, E.A. (2020) Host affinity of endophytic fungi and the potential for reciprocal interactions involving host secondary chemistry. *American Journal of Botany*. 107:1–10.

- Clarke, J.F. (1962) New species of microlepidoptera from Japan. *Entomology News*, 73:102.
- Coelho, M.C.F., França, F.H. (1987) Biologia, quetotaxia da larva e descrição da pupa e adulto da traça-do-tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 22: 129-135.
- De Bach, P., Rosen, D. (1991) *Biological control by natural enemies*. CUP Archive.
- De Bary, H.A. (1884) *Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze Mycetozoen und Bacterien*. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig, Berlin.
- Desneux, N., Luna, M.G., Guillemaud, T., Urbaneja, A. (2011) The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. *Journal of Pest Science*, 84 (4): 403-408.
- Desneux, N., Wajnberg, E., Wyckhuys, K.A., Burgio, G., Arpaia, S., Narváez-Vasquez, C.A., Pizzol, J. (2010) Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of pest science*, 83 (3): 197-215.
- El-Deeb, H.M., Lashin, S.M., Arab, Y.A.S. (2012) Reaction of some tomato cultivars to tomato leaf curl virus and evaluation of the endophytic colonisation with *Beauveria bassiana* on the disease incidence and its vector, *Bemisia tabaci*. *Arch Phytopath Plant Protoc*, 45:1538.
- Ferron, P. (1978) Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual review of entomology*, 23 (1): 409-442.
- Gautam, S., Mohankumar, S., Kennedy, J. S. (2016) Induced host plant resistance in cauliflower by *Beauveria bassiana*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4:476–82.

- Giustolin, T.A., Vendramim, J.D., Alves, S.B., Vieira, S.A. (2001) Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. to *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) reared on two genotypes of tomato. *Neotropical Entomology*, 30(3), 417-421.
- Golo, P.S., Gardner, D.R., Grilley, M. M., Takemoto, J. Y., Krasnoff, S. B., Pires, M. S., Fernandes, E. K. K., Bittencourt, V. R. E. P., Roberts, D. W. (2014) Production of destruxins from *Metarhizium* spp. fungi in artificial medium and in endophytically colonized cowpea plants. *PLoS One*, 9:104946.
- Gontijo, P.C., Picanço, M.C., Pereira, E.J.G., Martins, J.C., Chediak, M., Guedes, R.N.C. (2013) Spatial and temporal variation in the control failure likelihood of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta*. *Annals of Applied Biology*, 162:50-59.
- Gravena, S. (1984) Manejo integrado de pragas do tometeiro. In *Congresso Brasileiro, 24, e Reunião Latino Americana de Olericultura, 1*, UNESP, Jaboticabal, 129-149.
- Greenfield, M., Gómez-Jiménez, M.I., Ortiz, V., Vega, F. E., Kramer, M., Parsa, S. (2016) *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biological control*, 95: 40-48.
- Guedes, R.N.C., Picanço, M.C. (2012) The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance. *EPPO Bull*, 42:211-216.
- Guedes, R.N.C., Roditakis, E., Campos, M.R., Haddi, K., Bielza, P., Siqueira, H.A.A., Tsagkarakou, A., Vontas, J., Nauen, R. (2019) Insecticide resistance in the tomato pinworm *Tuta absoluta*: patterns, spread, mechanisms, management and outlook. *Journal of Pest Science*, 1-14.

- 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. *Biological control*, 55 (1): 34-41.
- Jaber, L.R., Araj, S.E. (2018) Interactions among endophytic fungal entomopathogens (Ascomycota: Hypocreales), the green peach aphid *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae), and the aphid endoparasitoid *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control*, 116: 53-61.
- Jaber, L.R.; Enkerli, J. (2017) Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth?. *Biocontrol science and technology*, 27 (1) 28-41.
- Jackson, M., Dunlap, C., Jaronski, S. (2010) Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *Biocontrol*, 55:129-145.
- Klieber, J., Reineke, A. (2016) The entomopathogen *Beauveria bassiana* has epiphytic and endophytic activity against the tomato leaf miner *Tuta absoluta*. *Journal of Applied Entomology*, v. 140, n. 8, p. 580-589.
- Lacey, L.A. (2012) *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Academic Press. 2^o Ed.
- 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. *Journal of invertebrate Pathology*, 132, 1-41.
- Leckie, B.M., Ownley, B.H., Pereira, R.M., Klingeman, W.E., Jones C.J., Gwinn K.D. (2008) Mycelia and spent fermentation broth of *Beauveria bassiana* incorporated into synthetic diets affects mortality, growth and development of larval *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Sci Technol*, 18:697–710.

- Leite, G.L.D., Picanço, M., Azevedo, A.A., Zurita, Y., Marquini, F. (1998) *Oviposición y mortalidad de Tuta absoluta en Lycopersicon hirsutum* (No. Hm).
- McKinnon, A.C., Saari, S., Moran-Diez, M.E., Meyling, N.V., Raad, M., Glare, T.R. *Beauveria bassiana* as an endophyte: a critical review on associated methodology and biocontrol potential. *Biocontrol*, 2017;62:1–17.
- Melo, P.C.T.D., Vilela, N.J. (2005) Desafios e perspectivas para a cadeia brasileira do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira*, 23(1), 154-157.
- Meyling, N.V., Eilenberg, J. (2007) Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological control*, 43 (2): 145-155.
- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2019) *AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários*.
- 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*, 18(3), 335-349.
- Morais, G.J., NORMANIIA-FILHO, J.A. (1982) Surto de *Serobipalpula absoluta* (Meyrick) em tomateiro no Trópico Semi-Atido. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 17(3): 503-4.
- Ownley, B.H., Griffin, M.R., Klingeman, W.E., Gwinn, K.D., Moulton, J.K., Pereira, R.M. (2008) *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98:267–70.

- Parsa, S., Ortiz, V., Veja, F.E. (2013) Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. *Journal of Visualized Experiments*.
- Picanço, M.C., Guedes, R.N.C. (1999) Manejo integrado de pragas no Brasil: situação atual, problemas e perspectivas. *Ação Ambiental*, Viçosa, v.2, n.4, p.23-26.
- Picanço, M.C., Paula, S.V., Junior, A.R.M., Oliveira, I.R., Semeão, A.A., Rosado, J.F. (2004) Impactos financeiros da adoção de manejo integrado de pragas na cultura do tomateiro. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 26 (2): 245-252.
- Pires, L.M., Marques, E.J., De Oliveira, J.V., Alves, S.B. (2010) Selection of isolates of entomopathogenic fungi for controlling *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) and their compatibility with insecticides used in tomato crop. *Neotropical entomology*, 39 (6): 977-984.
- 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). *Mycological research*, 111: 749-758.
- Pratissoli, D.; Parra, J.R.P. (2001) Seleção de linhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle das traças *Tuta absoluta* (Meyrick) e *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology*, 30 (2): 277-282.
- Qayyum, M.A., Wakil, W., Arif, M.J., Sahi, S.T., Dunlap, C.A. (2015) Infection of *Helicoverpa armigera* by endophytic *Beauveria bassiana* colonizing tomato plants. *Biological Control*, 90:200–7.
- Quesada-Moraga, E., Herrero, N., Zabalgoageazcoa, Í. (2014) Entomopathogenic and nematophagous fungal endophytes. In: Verma, V.C., Gange, A.C. (Eds.), *Advances in Endophytic Research*. Springer, India, 85 99.

- Quesada-Moraga, E., Landa, B.B., Muñoz-Ledesma, F.J., Jiménez-Díaz, R.M., Santiago-Alvarez, C. (2006) Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. *Mycopathologia*, 161: 323–329.
- Quesada-Moraga, E., López-Díaz, C., Beatriz-Landa, B., (2014) The hidden habit of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: first demonstration of vertical plant transmission. *PLoS One* 9.
- 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. *Journal of invertebrate pathology*, 136: 23-31.
- Russo, M.L., Pelizza, S.A., Cabello, M.N., Stenglein, S.A., Scorsetti, A.C. (2015) Endophytic colonisation of tobacco, corn, wheat and soybeans by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales). *Biocontrol Science Technology*, 25:475–80.
- Sakulkoo, W., Oses-Ruiz, M., García, E.O., Soanes, D.M., Littlejohn, G.R., Hacker, C., Correia, A., Valent, B., Talbot, N.J. (2018) A single fungal MAP kinase controls plant cell-to-cell invasion by the rice blast fungus. *Plant Sci*, 359:1399–403.
- Samuels, R.I., Charnley, A.K., Reynolds, S.E. (1988) The role of destruxins in the pathogenicity of three strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Mycopathologia*, 104:51–8.
- Sánchez-Rodríguez, A.R., Del Campillo, M.C., Quesada-Moraga E. (2015) *Beauveria bassiana*: an entomopathogenic fungus alleviates Fe chlorosis symptoms in plants grown on calcareous substrates. *Sci Horticult*, 197:193–202.

- Sankarganesh, E., Firake, D. M., Sharma, B., Verma, V. K., Behere, G. T. (2017) Invasion of the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, in northeastern India: a new challenge and biosecurity concerns. *Entomologia Generalis*, 36:335–345.
- Santana, P.A., Kumar, L., Da Silva, R.S., Picanço, M.C. (2019) Global geographic distribution of *Tuta absoluta* as affected by climate change. *Journal of Pest Science*, 1-13.
- Shrivastava, G., Ownley, B.H., Augé, R.M., Toler, H., Dee, M., Vu, A., Köllner, T.G., Chen, F. (2015) Colonization by arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi enhanced terpene production in tomato plants and their defense against a herbivorous insect. *Symbiosis*, 65:65–74.
- Silva, G.A., Picanço, M.C., Bacci, L., Crespo, A.L.B., Rosado, J.F., Guedes, R.N.C. (2011) Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *Pest management science*, 67 (8): 913-920.
- Strasser, H., Vey, A., Butt, T.M. (2000) Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Toxopneustes* and *Beauveria* species? *Biocontrol Sci Technol*, 10:717–35.
- Tan, R.X., Zou, W.X. (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep*, 18:448–59.
- Uchoa-Fernandes, M.A., Della Lucia, T.M.C., Vilela, E.F. (1995) Mating, oviposition and pupation of *Scrobipalpus absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Jaboticabal*, 24 (1):159-164.

- Urbaneja, A., González-Cabrera, J., Arno, J., Gabarra, R. (2012) Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. *Pest management science*, 68 (9):1215-1222.
- Vega, F.E. (2018) The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. *Mycologia*.
- Vega, F.E. (2008) Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of invertebrate pathology*, 98 (3): 277-279.
- Veiga, A.C.P. (2014) Compatibilidade entre produtos químicos e biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner no controle de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae).
- Wagner, B.L., Lewis, L.C. (2000) Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3468–3473.
- Wang, Q., Xu, L. (2012) Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. *Molecules*, 17:2367–77.
- Zekeya, N., Mtambo, M., Ramasamy, S., Chacha, M., Ndakidemi, P.A., Mbega, E.R. (2019) First record of an entomopathogenic fungus of tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick) in Tanzania. *Biocontrol Science and Technology*, 29 (7):626-637.