Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Produção de microescleródios de *Metarhizium* spp. para inoculação de sementes de milho visando o controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Aline Cesar de Lira

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2019

Aline Cesar de Lira
Bacharela em Agronomia

Produção de microescleródios de *Metarhizium* spp. para inoculação de sementes de milho visando o controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ÍTALO DELALIBERA JÚNIOR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Lira, Aline Cesar de

Produção de microescleródios de *Metarhizium* spp. para inoculação de sementes de milho visando o controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) / Aline Cesar de Lira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

54 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Fungo entomopatogênico 2. Fermentação líquida 3. Bioestimulante de plantas 4. *Dalbulus maidis* I. Título

Aos meus pais, Leonete e Luiz Fernando (*in memoriam*),

pelo amor, carinho, educação e apoio.

Ao meu amado irmão, Rafael Lira, pela fiel amizade.

Ao meu companheiro, Rafael Ribeiro, pelo amor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP) pela oportunidade de ensino e profissionalização;

Ao Prof. Dr. Ítalo Delalibera Júnior por ter me recebido no laboratório, pela orientação, confiança depositada e valiosa contribuição profissional e pessoal;

Ao Dr. Gabriel Moura Mascarin pela inestimável colaboração na construção do projeto, análise estatística e por todo o apoio intelectual e moral;

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP pelo conhecimento e experiências compartilhadas;

A Solange Aparecida Vieira Barros, técnica do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano da ESALQ-USP, pela colaboração e compartilhamento de informações para o desenvolvimento da pesquisa;

A Neide Graciano Zério, técnica do Laboratório de Biologia de Insetos da ESALQ-USP, pelas sugestões e por providenciar as lagartas de *Spodoptera frugiperda* para os bioensaios;

Aos amigos e colegas da Pós-Graduação em Entomologia e Acarologia da ESALQ pela convivência, conhecimento compartilhado e pelos momentos dentro e fora da Escola;

Aos amigos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano (ESALQ-USP) pelos momentos juntos, ajuda com os experimentos e conversas na hora do café. As pós-doutorandas Vanessa da Silveira Duarte e Celeste Paola D'Alessandro pela disposição, paciência e aulas ministradas. Aos amigos que compartilhei sala, experiências e inquietações: Dani, Bianca, Mariana, Joel, Carol, Fernanda, Taisa, Vitor, Isabella, Bruna e Natasha. Tenho todos vocês com muito carinho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento de bolsa de estudo que foi indispensável durante o período de pesquisa;

A todos da minha família que contribuíram com a minha formação como pessoa, pelo apoio, motivação e carinho. Em especial a minha mãe e ao meu irmão pelo amor, carinho, dedicação e por todos os momentos que já passamos juntos;

Ao meu companheiro Rafael Ribeiro pelo amor, paciência, apoio, por acreditar em mim e me fazer muito feliz;

A todos que de alguma forma colaboraram com a concretização dessa pesquisa;

Muito obrigada!

**“Rendei graças ao Senhor, porque ele é bom,
e a sua misericórdia dura para sempre.”**

Salmos 107.1
(Bíblia Sagrada)

SUMÁRIO

RESUMO **7**

ABSTRACT **8**

1. INTRODUÇÃO **9**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **11**

2.1. IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO MILHO (*ZEA MAYS*) 11
2.2. INSETOS PRAGA NA CULTURA DO MILHO: *SPODOPTERA FRUGIPERDA* E *DALBULUS MAIDIS* 12
2.2.1 *DALBULUS MAIDIS* 12
2.2.2 *SPODOPTERA FRUGIPERDA* 13
2.3. O GÊNERO *METARHIZIUM* 14
2.3.1 MICROESCLERÓDIOS DE *METARHIZIUM* 16

3. MATERIAL E MÉTODOS **19**

3.1. CRIAÇÃO DE INSETOS 19
3.2. PRODUÇÃO DE MICROESCLERÓDIOS: AVALIAÇÃO DE 48 ISOLADOS DE *METARHIZIUM* SPP. 20
3.3. PRODUÇÃO DE MICROESCLERÓDIOS DE TRÊS ISOLADOS SELECIONADOS DE *METARHIZIUM* SPP. 23
3.4. COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA, DENSIDADE DE *METARHIZIUM* SPP. NO SOLO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO INOCULADAS VIA SEMENTE 24
3.5. EFICÁCIA NO CONTROLE DE *DALBULUS MAIDIS* E *SPODOPTERA FRUGIPERDA* EM PLANTAS INOCULADAS POR *METARHIZIUM* SPP. 26
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA 27

4. RESULTADOS **29**

4.1. SELEÇÃO DE ISOLADOS *METARHIZIUM* SPP. PARA PRODUÇÃO DE MICROESCLERÓDIOS 29
4.2. DESEMPENHO DOS ISOLADOS SELECIONADOS DE *METARHIZIUM* SPP. 31
4.3. COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA, DENSIDADE DE *METARHIZIUM* SPP. NO SOLO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DAS PLANTAS DE MILHO INOCULADAS 32
4.4. EFICÁCIA DE MICROESCLERÓDIOS DE *METARHIZIUM* SPP. NO CONTROLE DE *DALBULUS MAIDIS* E *SPODOPTERA FRUGIPERDA* 36

5. DISCUSSÕES **39**

REFERÊNCIAS **45**

RESUMO

Produção de microescleródios por isolados de *Metarhizium* spp. para inoculação de sementes de milho visando o controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Os fungos do gênero *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) são conhecidos pelo potencial como agentes de controle de artrópodes que causam danos econômicos a agricultura como cigarrinhas, coleopteros, lagartas e ácaros. Algumas espécies de *Metarhizium* são capazes de produzir estruturas de resistência conhecidas como microescleródios. Essas estruturas oferecem vantagens ao controle de pragas devido à grande formação de conídios *in situ* e persistência no ambiente sob condições adversas de temperatura e radiação solar. Ainda, a produção *in vitro* de microescleródios de *Metarhizium* em fermentação líquida é mais rápida e com controle maior das condições de cultivo comparada com a produção de conídios aéreos. Entretanto, o potencial de microescleródios como inoculantes de sementes para o controle de pragas de parte aérea de plantas não foi explorado. No presente estudo verificou-se a habilidade de microescleródios de *Metarhizium* spp em promover o crescimento vegetativo de plantas de milho e proteção de plantas ao ataque de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae), através do tratamento de sementes de milho. A produção de microescleródios foi realizada por fermentação em meio líquido com relação carbono:nitrogênio de 10:1, contendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Uma seleção para encontrar os isolados com maior produção de microescleródios foi realizada com o cultivo de 48 isolados de *Metarhizium* spp. nativos do Brasil (*Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium robertsii*, *Metarhizium humberi* e *Metarhizium* sp. Indeterminada 2 e 3). Os isolados mais produtivos de cada espécie, *M. anisopliae* ESALQ1814, *M. robertsii* ESALQ2450 e *M. humberi* ESALQ1638, foram utilizados para promover o crescimento de plantas de milho e proteção contra pragas, através do tratamento de sementes de milho com grânulos de microescleródios. Em geral, as plantas de milho inoculadas com os três isolados de *Metarhizium* spp. apresentaram maior desenvolvimento (área e peso seco de folha, comprimento e peso seco de raiz, comprimento e peso seco de plantas) do que as plantas não inoculadas. Lagartas de *S. frugiperda* apresentaram diminuição na sobrevivência (mortalidade maior que 55% no sétimo dia) que o controle, quando alimentadas com plantas de milho inoculadas por fungo. Por outro lado, não houve efeito na sobrevivência de adultos de *Dalbulus maidis* alimentados com plantas inoculadas por fungo. Os resultados obtidos sugerem que a inoculação de semente de milho por microescleródios de *Metarhizium* spp. representa alternativa ao controle convencional de pragas, e possui potencial para promover o crescimento de plantas e auxilia no manejo de *S. frugiperda*.

Palavras-chave: Fungo entomopatogênico, Fermentação líquida, Bioestimulante de plantas, *Dalbulus maidis*

ABSTRACT

Production of microsclerotia by isolates of *Metarhizium* spp. for inoculation of maize seeds for the control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

The fungi of the genus *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) are known for the potential as control agents of arthropods that cause economic damage to agriculture such as leafhoppers, beetles, caterpillars and mites. The fungi *Metarhizium* comprises species capable of producing resistant structures known as microsclerotia. These structures offer advantages to pest control due to the large formation of conidia *in situ* and persistence in the environment under adverse conditions of temperature and UV radiation. In addition, the *in vitro* production of *Metarhizium* microsclerotia under controlled liquid fermentation is faster and with greater control of the conditions than the production of aerial conidia. However, there are no reports regarding the potential of *Metarhizium* microsclerotia as plant inoculant for control of aboveground pests. In this study, the ability of *Metarhizium* spp. microsclerotia to promote corn growth and to support plant protection against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) were verified, through seed coating. Liquid fermentation of conidia was carried out using liquid cultivation with carbon:nitrogen ratio of 10:1, containing yeast extract as nitrogen source. A screening to find the higher microsclerotia producers was carried out by culturing 48 native Brazilian isolates of *Metarhizium* spp. (*Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium robertsii*, *Metarhizium humberi* and *Metarhizium* sp. indeterminate 2 and 3). The best microsclerotia producer of each specie, *M. anisopliae* ESALQ1814, *M. robertsii* ESALQ2450 and *M. humberi* ESALQ1638, were examined for its ability to promote corn growth and support plant protection against pests, through seed coating using microsclerotia granules. Overall, corn plants inoculated with the three isolates of *Metarhizium* spp. presented higher development (leaf area and dry weight, root length, root dry weight, length and dry weight of plants) than non-inoculated plants. *S. frugiperda* caterpillars presented a decrease in survival (mortality above 55% on the seventh day) than the control, when fed on corn plants treated with fungi. On the other hand, no effect in the survival was observed on *Dalbulus maidis* fed with fungus-inoculated plants. The results obtained suggest that the inoculation of corn seed by microsclerotia of *Metarhizium* spp. is an alternative pest control, and has the potential to promote plant growth and also help in the management of *S. frugiperda*.

Keywords: Entomopathogenic fungus, Liquid fermentation, Plant biostimulant, *Dalbulus maidis*

1. INTRODUÇÃO

Metarhizium (Metschnikoff) Sorokin, 1883 (Ascomycota: Hypocreales: Clavicipitaceae) são fungos entomopatogênicos empregados no controle biológico de pragas agrícolas. Os fungos do gênero *Metarhizium* podem ser encontrados em regiões temperadas, subtropicais e tropicais (ROBERTS; ST. LEGER, 2004). Dentre os propágulos desse fungo, o uso das estruturas de resistência denominadas microescleródios podem conferir vantagens ao controle biológico de pragas. A formação de microescleródio ocorre exclusivamente sob cultivo *in vitro* em condições nutricionais e físicas apropriadas (JACKSON; JARONSKI, 2009; MASCARIN et al., 2014). A germinação vegetativa de microescleródio ocorre por formação de hifas e, subsequentemente, há a esporulação mediante formação de conídios infectivos *in situ* quando reidratados (JARONSKI; JACKSON, 2008). Os conídios possuem habilidade de penetrar a cutícula e colonizar a hemocele do inseto levando o hospedeiro a morte. Conídios produzidos por um único microescleródio podem levar à morte insetos no solo, podendo ser tão eficaz quanto ou superior aos conídios aéreos produzidos em substrato sólido (JACKSON; JARONSKI, 2009).

Outras funções ecológicas desempenhadas por *Metarhizium* se referem à sua capacidade em colonizar endofiticamente algumas plantas mono e dicotiledôneas, especialmente a rizosfera de plantas, e sua capacidade de sobreviver no solo saprofiticamente. A interação do fungo com a planta pode ativar mecanismos de defesa do vegetal e promover o controle de insetos de parte aérea (RÍOS-MORENO et al., 2016). Existe uma relação tritrófica entre *Metarhizium*, o inseto e a planta, podendo o fungo translocar nitrogênio do inseto infectado para as raízes de planta adjacente (BEHIE; ZELISKO; BIDOCHKA, 2012).

Em vista de mitigar os danos causados pelas pragas de maneira menos agressiva e com menor impacto negativo ao ambiente, o uso de fungos entomopatogênicos é uma alternativa ao uso do controle convencional para o controle de pragas agrícolas. O potencial de microescleródios de *Metarhizium* spp. como agente de controle de pragas em milho *Zea mays* L. (Poaceae) foi pouco explorado. A cultura do milho possui grande importância econômica no mundo e os prejuízos podem ser irreversíveis devido ao ataque de insetos pragas. Entre as principais pragas da cultura do milho, destacam-se a cigarrinha-do-milho (*Dalbulus maidis*) e a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*). Neste contexto, grânulos de microescleródios de *Metarhizium* spp. foram utilizados para inoculação de sementes de milho visando o controle de *D. maidis* e *S. frugiperda*.

O objetivo do autor foi: i) selecionar isolados de *Metarhizium* spp. com alta produtividade de microescleródios via fermentação líquida submersa; ii) formular e estimar a

viabilidade e produção de conídios de microescleródios dos três isolados de *Metarhizium* spp. selecionados; iii) avaliar a sobrevivência de *D. maidis* e *S. frugiperda* alimentadas com plantas inoculadas por microescleródios de *Metarhizium* spp.; iv) avaliar a ação endofítica do fungo e os efeitos no crescimento vegetativo de plantas de milho que foram colonizadas via semente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância da cultura do milho (*Zea mays*)

O milho (*Zea mays* L. subsp. *mays*) apresenta grande importância socioeconômica sendo a cultura mais cultivada no mundo. O grão de milho é de uso versátil destacando-se como fonte de alimento animal e, consequentemente, humano (BORÉM; GALVÃO; PIMENTEL, 2015). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho (*Zea mays* L.) sendo os dois maiores produtores os EUA e a China. No Brasil, a produção de milho foi acima de 80 milhões de toneladas por ano, de acordo com estimativas nos últimos anos da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018; CONAB, 2019). Do total da produção brasileira de milho, a Região Centro-Oeste do Brasil contribui com aproximadamente 50% do produzido no país, sendo a produção dessa região concentrada no período de segunda safra ou safrinha (CONAB, 2019). A alta produção de milho possibilita a exportação do grão que está entre as principais commodities na agricultura brasileira. Apesar da alta produção de milho, no Brasil existem perdas devido ao ataque de artrópodes pragas que pode estar associado à diminuição da eficiência do uso de métodos convencionais de controle.

Plantas de milho podem sofrer perdas de produtividade devido a efeitos abióticos e bióticos. Dentro dos efeitos bióticos se destacam os insetos-pragas devido as perdas econômicas causado aos agricultores. Estima-se que os danos provocados por insetos geram perdas na produtividade de 5,7 milhões de toneladas do grão por ano no Brasil (OLIVEIRA et al., 2014). As pragas podem causar danos as raízes ou a parte aérea das plantas e estão taxonomicamente agrupadas nas mais diversas ordens de insetos (KABALUK; ERICSSON, 2007). Além dos danos por herbivoria, as plantas de milho estão sujeitas a aquisição de doenças por insetos vetores.

A cultura do milho passou por importantes modificações por ferramentas de biotecnologia resultando eventos capazes de mudar o cenário do controle de insetos pragas. Entretanto, relatos no Brasil e no mundo da evolução no processo de populações de insetos resistentes à tecnologia comprometeram a eficácia da utilização desses eventos (STORER et al., 2010; FARIAS et al., 2014; LEITE et al., 2016).

2.2. Insetos praga na cultura do milho: *Spodoptera frugiperda* e *Dalbulus maidis*

2.2.1 *Dalbulus maidis*

Dalbulus maidis (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae), popularmente conhecida por cigarrinha-do-milho ocorre em grande parte do Continente Americano desde o sul dos Estados Unidos da América até a Argentina (NAULT, 1990; CARLONI et al., 2013). No Brasil, a cigarrinha-do-milho anteriormente era considerada praga secundária; atualmente tornou-se abundante no campo nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (OLIVEIRA et al., 1998). O aumento populacional da praga está associado aos cultivos sucessivos do milho em duas safras (verão e inverno), o que contribui com a disponibilidade de plantas hospedeiras.

Na cultura do milho, a cigarrinha-do-milho atua como vetor de patógenos responsáveis pelo enfezamento vermelho (Maize Bushy Stunt Phytoplasma) e enfezamento pálido (Corn Stunt Spiroplasma e Spiroplasma kunkelli), ambos associados à classe Mollicutes. Os sintomas dessas doenças em plantas de milho são caracterizados por estrias nas folhas de coloração cloróticas (enfezamento pálido) ou avermelhadas (enfezamento vermelho), porte de planta menor, produção de grão reduzida e número desregulado de espigas (NAULT, 1980; OLIVEIRA et al., 1998). Além das doenças de enfezamento, o inseto também é responsável pela doença virótica Maize Rayado Fino Vírus (AMMAR et al., 2011).

Os fitopatógenos associados aos enfezamentos (pálido e vermelho) são encontradas geralmente no floema da planta e no inseto hospedeiro. A transmissão a partir da planta infectada para o inseto saudável ocorre pela sucção de seiva durante a alimentação do inseto. Os insetos infectados apresentam os molicutes nas células do intestino que se replicam pelo corpo e saliva do artrópode. Plantas saudáveis adquirem o enfezamento pela transmissão dos molicutes pelo inseto infectado ao se alimentar dessas plantas (WEBB et al., 1999; CHRISTENSEN et al., 2005; HOGENHOUT et al., 2008).

O controle das doenças em que *D. maidis* é vetor consiste em medidas culturais como plantas mais tolerantes, erradicação de plantas daninhas e plantio de milho em localidades que não apresentem histórico de alta infestação das doenças (SABATO; LANDAU; OLIVEIRA, 2014). O controle químico consiste em tratamento de semente com inseticidas sistêmicos para evitar infestações em plântulas. No Brasil dentre os produtos registrados para o controle estão inseticidas químicos do grupo dos neonicotinóide e inseticida biológico a base de *Beauveria bassiana* (AGROFIT, 2019).

2.2.2 *Spodoptera frugiperda*

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) ou lagarta-do-cartucho é um inseto polífago considerado no Brasil uma praga chave na cultura do milho. A ocorrência do inseto pode ser observada nas Américas Norte, Central e Sul e recentemente em regiões do Continente Africano (NAGOSHI; MEAGHER, 2004; BATISTA-PEREIRA et al., 2006; BAUDRON et al., 2019). As lagartas durante o processo de alimentação danificam plantas de milho desde a emergência da plântula até a formação de espigas (CRUZ, 1995). Além de ser praga na cultura do milho, há relatos de danos econômicos em outras culturas agrícolas de importância com em arroz, algodão, trigo, sorgo e amendoim (CRUZ, 1995; NAGOSHI; MEAGHER, 2004).

A biologia da *S. frugiperda* consiste em desenvolvimento em metamorfose completa: ovo, lagarta, pupa e adulto. Os ovos são dispostos em camadas ou em uma única camada nas folhas da planta hospedeira e a eclosão ocorre em média de dois a três dias (CRUZ; FIGUEIREDO; SILVA, 2010). Fêmeas adultas possuem alto potencial reprodutivo sendo capazes de depositar em média 1600 ovos durante a vida. A fase de lagarta compreende seis ínstares com duração média de 12 a 30 dias e dependente das condições climáticas, sobretudo a temperatura. A característica morfológica para identificação de lagartas pode ser a fronte com sutura em forma de "Y" invertido (CRUZ, 1995). As lagartas nos primeiros ínstares se alimentam de um lado da folha provocando manchas opacas na epiderme. Após o segundo ínstar as lagartas apresentam comportamento canibal, sendo comum uma lagarta por planta (ÁVILA; DEGRANDE; GOMEZ, 1997). Após o terceiro ínstar as lagartas são capazes de provocar danos mais severos as folhas e ao cartucho das plantas de milho (VALICENTE; TUELHER, 2009). Posteriormente a fase de lagartas, as pupas se formam no solo ou no interior do cartucho do milho até a emergência dos adultos. Os adultos são ativos durante a noite e durante o dia se escondem sob a folhagem e próximo ao solo (CRUZ, 1995).

A persistência nas áreas agrícolas da lagarta-do-cartucho em níveis populacionais elevados é intensificada devido ao cultivo sucessivo de plantas hospedeiras. O cultivo de milho durante o verão e inverno e a disponibilidade de áreas irrigadas vem aumentando o uso de inseticidas para o controle de pragas e desencadeando o processo de seleção de populações de insetos resistentes (CARVALHO et al., 2013). Eventos de milho transgênico foram largamente empregados para garantir o controle de *S. frugiperda*; contudo relatos de populações de lagartas resistentes a eventos de milho contendo proteínas de Bt (*Bacillus thuringiensis*) comprometem a alta eficiência da técnica (FARIAS et al., 2014; OMOTO et al., 2016). Em busca de opções

alternativas ao controle químico, trabalhos mostram a suscetibilidade de lagartas pragas a *Metarhizium* e seu uso como agente no controle biológico (HUMBER; HANSEN; WHEELER, 2011; COSTA et al., 2015; FRONZA et al., 2017).

2.3. O gênero *Metarhizium*

Algumas espécies de fungos são consideradas entomopatogênicos pela eficiência no controle de pragas agrícolas. Em biomas do território brasileiro são encontradas espécies de fungos entomopatogênicos que são capazes de manter o equilíbrio dos níveis populacionais de insetos. Esses fungos podem ser empregados como ferramenta no controle biológico de pragas por meio de aplicações inundativas em áreas agrícolas. Visando o controle de praga os principais e mais comercializados fungos são da ordem Hypocreales dos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria*. Tais fungos geralmente apresentam propagação na natureza ou *in vitro* na forma anamórfica de conídios, blastosporos, conídios submersos e microescleródios (JARONSKI, 2014).

Metarhizium (Metschnikoff) Sorokin, 1883 são fungos do filo Ascomycota da família Clavicipitaceae, cosmopolita e amplamente empregado como agente de biocontrole de artrópodes pragas de inúmeros cultivos agrícolas. O complexo *Metarhizium* compreende espécies filogeneticamente identificadas por meio de técnicas moleculares como: *M. anisopliae*, *M. acridum*, *M. brunneum*, *M. globosum*, *M. guizhouense*, *M. humberi*, *M. lepidiotae*, *M. majus*, *M. pingshaense* e *M. robertsii* (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009, LUZ et al., 2019). Espécies do gênero *Metarhizium* estão presentes em regiões tropicais e temperadas no mundo (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009) e podem ser encontrados infectando insetos (REZENDE et al., 2015), agindo endofiticamente na rizosfera de plantas (SASAN; BIDOCHKA, 2012) e saprofiticamente em solos (HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ; GUZMÁN-FRANCO, 2017). O incremento da ação de *Metarhizum* no ambiente pode ser dado com a aplicação inundativa de propágulos do fungo com o objetivo de aumentar a concentração de conídios infectivos a insetos. Existem relatos de *Metarhizium* infectando mais de 100 espécies de artrópodes em diferentes ordens de insetos como Hemiptera (HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2016), Coleoptera (SEPULVEDA et al., 2016), Isoptera (WRIGHT; CORNELIUS, 2012), Diptera (YOUSEF et al., 2017) e Orthoptera (HUNTER et al., 2016), além de outros artrópodes como ácaros (BUGEME et al., 2015; CASTRO; EILENBERG; DELALIBERA, 2018).

Fungos entomopatogênicos podem exercer ação endofítica em diferentes espécies de plantas (VEGA et al., 2009; PAVA-RIPOLL et al., 2011; BEHIE; JONES; BIDOCHKA, 2015; LACEY et al., 2015). O fungo quando endofítico coloniza internamente os tecidos vegetais de plantas sem causar danos aparentes a essas plantas (CARROLL, 1986). A colonização do fungo nas diferentes partes da planta é desigual, como no caso do fungo *Beauveria* agir endofiticamente por toda a planta enquanto que *Metarhizium* estar mais associado à rizosfera das plantas (SASAN; BIDOCHKA, 2012; BEHIE; JONES; BIDOCHKA, 2015; VEGA, 2018). Na literatura, a ação endofítica está relatada em vários trabalhos como *M. robertsii* em sorgo (*Sorghum bicolor*) para o controle da broca do milho (*Sesamia nonagrioides*) (MANTZOUKAS; CHONDROGIANNIS; GRAMMATIKOPOULOS, 2015); *M. brunneum* agindo endofíticamente em feijão (JABER; ENKERLI, 2016); *M. anisopliae* na promoção de crescimento em plantas de tomate (GARCÍA et al., 2011). A colonização endofítica de fungos em plantas pode resultar na produção de fitormônios relacionados com o sistema de defesa de planta como ácido salicílico e ácido jasmônico bem como na produção de metabólitos secundários dos fungos como destruxinas e beauvericina (GOLO et al., 2014; SIDDAIAH et al., 2017; MALLEBRERA et al., 2018). Esses compostos produzidos pela planta ou fungo podem resultar em relação de antibiose no qual o controle de pragas ocorre de forma indireta pela inibição da herbivoria. Além disso, estudos mostraram mortalidade significativa de duas importantes espécies de insetos pragas em crucíferas que foram alimentados por folhas de couve previamente tratadas por destruxinas provenientes de *Metarhizium anisopliae* (AMIRI; IBRAHIM; BUTT, 1999).

A capacidade de *Metarhizium* infectar insetos no solo e estar associado à raizes de plantas possibilita uma relação tritrófica entre planta, inseto e fungo. O fungo é capaz de translocar nitrogênio do inseto morto para a planta que em troca disponibiliza carbono para o fungo (BEHIE; ZELISKO; BIDOCHKA, 2012; BEHIE et al., 2017). Foi detectada a associação de *Metarhizium* spp. (*M. robertsii*, *M. brunneum* e *M. guizhouense*) na rizosfera de 51% das plantas analisadas de solos no Canadá (WYREBEK et al., 2011). *Diabrotica* spp. (HOFFMANN et al., 2014), insetos da família Termitidae (KHAENJE; GOHOLE; MANIANIA, 2013) e corós da família Melolonthidae (PEREIRA; SALVADORI, 2006) são exemplos de artrópodes pragas que passam parte do ciclo de vida no solo possibilitando o contato facilitado com o fungo entomopatogênico.

Alguns estudos foram realizados para avaliar os efeitos letais e sub-letais dos fungos entomopatogênicos em inimigos naturais. Na literatura há relatos de compatibilidade entre o uso de fungos por endofitismo e o uso de parasitóides e predadores (GATHAGE et al., 2016). Foi

observada a ausência de efeitos deletérios significativo no ciclo de vida de microhimenópteros e predadores após o contato com pulgões sobre plantas colonizadas endofiticamente por entomopatógenos (JABER; ARAJ, 2017; GONZÁLEZ-MAS et al., 2019).

O primeiro inseticida microbiano à base de fungo registrado comercialmente no Brasil continha *M. anisopliae* (BETTIOL, 2011). No Brasil, em torno de 34 produtos a base de *M. anisopliae* estão registrados pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento principalmente para o controle em áreas de cana-de-açúcar e pastagens (AGROFIT, 2019). Cerca de dois milhões de hectares de área cultivada com cana-de-açúcar no país são submetidos à aplicação de *M. anisopliae*, correspondente a 20% da área total de cana-de-açúcar no território brasileiro (PARRA, 2014).

2.3.1 Microescleródios de *Metarhizium*

Fungos submetidos a situações adversas podem desenvolver estruturas especializadas de resistência para aumentar as chances de sobrevivência do inóculo. As condições desfavoráveis à persistência do fungo no ambiente geralmente estão ligadas a fatores microclimáticos e falta de hospedeiro. O gênero *Metarhizium* possui espécies com a capacidade de produzir microescleródios que são estruturas de resistência, pigmentadas e compactas devido à agregação de hifas (JARONSKI; JACKSON, 2008). A germinação de microescleródios de *Metarhizium* ocorre em condições de alta umidade gerando a produção de conídios de forma dessincronizada no tempo. Espécies de *Metarhizium* são capazes de formarem microescleródios, com exceção da espécie de *M. acridum* (JARONSKI, 2013). A formação de microescleródios tipo pelete do gênero *Beauveria* foi observada por Huarte-Bonnet et al. (2019).

A formação de microescleródios de *Metarhizium* (=*Nomuraea*) *rileyi* foi estudada por Zhou et al. (2015). Na maioria dos fungos existem duas cadeias de transporte de elétrons na respiração que ocorrem na mitocôndria: uma cadeia clássica com citocromo cianeto oxidase (c-oxidase) como a oxidase terminal e uma cadeia alternativa, que se ramifica da membrana mitocondrial interna e usa a oxidase alternativa (Aox) como oxidação terminal. A expressão de Aox está relacionada com estresses do ser vivo que reduzem o fluxo de elétrons da respiração. No processo inicial de formação de microescleródios de *M. rileyi* foi observada a expressão crescente do gene de oxidase alternativa (Nraox) (YOU-PING et al., 2012; ZHOU et al., 2015). Entretanto, houve decrescente formação de estruturas de resistência do fungo com a presença de

ácido salicilhidroxâmico, responsável pela inibição da Nraox, (SONG et al., 2013). Além disso, os autores identificaram 17 genes que são expressos durante a formação de microescleródios pelo fungo *M. riley*, sendo esses genes relacionados à respiração mitocondrial. Portanto, a formação de microescleródios está intimamente ligada à ativação da rota de respiração alternativa devido à menor disponibilidade de oxigênio no meio de cultura. A diminuição de oxigenação pode ser ajustada com a diminuição da agitação do meio líquido.

A produção de microescleródios de fungos entomopatogênicos ocorre *in vitro* sob condições controladas e em meio de cultura líquido específico (JACKSON; JARONSKI, 2009). O método de produção de microescleródio de *Metarhizium* pode ser realizado em fermentação líquida em torno de quatro dias. Tendo-se em vista a economia no tempo de produção a obtenção de microescleródios é menor se comparado ao tempo de fermentação sólida em arroz na produção de conídios (14 dias). Assim, as vantagens de cultivo em meio líquido estão relacionadas à obtenção rápida de propágulos do fungo e maior controle das propriedades físico e químico do meio de cultura (YPSILOS; MAGAN, 2005).

Posteriormente a produção em meio líquido, as estruturas de resistência do fungo podem passar por processo de secagem para posterior armazenamento. A secagem de microescleródios ocorre em equipamento spray-dryer ou em câmara de secagem, ambos com o objetivo de atingir atividade de água em torno de 0,3 a_w. Aos microescleródios podem-se adicionar inertes para estabilização em um produto final. Goble et al. (2016a) ao utilizarem diferentes inertes (terra de diatomácea, caulim e MCC) para compor a mistura com microescleródios não observaram diferença significativa na concentração de conídios e inertes adicionados. Nesse estudo os autores observaram formação de conídios a partir de microescleródios de $6{,}0\times10^9$ conídios g^{-1} a partir de MS+inerte sobre ágar-água a 4%. O número de conídios formados por MS é maior em meio rico em nitrogênio e carbono, sendo o último componente mais limitante para alta produção de conídios (JACKSON; JARONSKI, 2016). Produção de conídios foi superior ($8{,}5\times10^9$ conídios g^{-1} de MS) quando o MS foi obtido em meio mais rico em nitrogênio (relação C:N de 30:1) que MS obtido em meio mais pobre com relação C:N de 50:1 ($5{,}5\times10^9$ conídios g^{-1} de MS) (BEHLE; JACKSON, 2014).

Microescleródios podem ser desidratados em forma de grânulos e posteriormente reidratados para formação de conídios infectivos a insetos e capazes de estabelecer relação com as raízes de plantas (JACKSON; DUNLAP; JARONSKI, 2010). A produção de conídios de *Metarhizium brunneum* (F52) é maior em condições de laboratório (na ordem de 10^9) e menor em exposição às condições de floresta (na ordem de 10^7-10^8) (GOBLE et al., 2016b). A capacidade

de distribuir alta concentração de conídios confere vantagens ao emprego de microescleródios de entomopatógenos no controle de pragas. Um único grânulo de MS oferece concentração letal de conídios a um inseto (JARONSKI; JACKSON, 2008). A inoculação do solo com microescleródios de *Metarhizium* possui vantagens à aplicação de conídios ou blastosporos no dossel de plantas. Há possibilidade de aplicação de microescleródios em condições de tempo com baixa umidade, radiação ultravioleta com valores altos e temperatura alta enquanto que a aplicação de conídios e blastosporos requerem um cuidado maior no momento de aplicação em condições de campo. No solo as estruturas de resistência do fungo estão protegidas dos danos provocados por radiação solar UV (FARGUES et al., 1997), variação extrema de temperatura (MEYLING; EILENBERG, 2007), volume de chuva que levem o fungo para longe do local de aplicação e estresse por dessecação (INGLIS; GOETTEL; JOHNSON, 1993; GARCÍA et al., 2011). Além disso, os microescleródios são capazes de produzir conídios que controlam artrópodes no solo não atingidos pelo controle tópico (BEHIE; JONES; BIDOCHKA, 2015). Portanto, a aplicação granular de microescleródios é a forma mais eficiente de inocular o fungo entomopatogênico para colonização de plantas e como estratégia de controle de insetos de solo.

Microescleródios de *Metarhizium brunneum* foram obtidos em meio líquido segundo Jackson e Jaronski (2009) após 4 dias de fermentação em agitação de 300 rpm, seguido de adição de argila (BEHLE; JACKSON, 2014). Segundo os autores a mortalidade foi acima de 90% de larvas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) quando em contato com solo inoculado por MS de *M. brunneum*. Em outro estudo, microescleródios de *M. brunneum* atingiram o controle de 74% de ninfas de *Ixodes scapularis* (Acari: Ixoididae) após seis semanas de exposição continua (BEHLE; JACKSON; FLOR-WEILER, 2013). Behle et al. (2015) observaram que microescleródios de *Metarhizium brunneum* (F52) foram mais eficientes que formulado de conídios no controle de besouro praga de áreas urbanas, o *Popillia japônica* (Coleoptera: Scarabaeidae). Os autores estimaram custo por quilo do fungo de 2,10 dólares para microescleródios frente a 75 dólares para o produto comercial a base de conídios. Em estudos por Goble et al. (2016b) houve mortalidade de besouros praga de madeira, o *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). Segundo os autores houve produção de conídios por MS de *Metarhizium* após mais de 25 dias de exposição a condições de campo durante o verão e produção maior que 5×10^{6} conídios cm^{-2} em superfície contendo grânulos de MS de *M. brunneum* em hidromulch ($3{,}5\times10^{8}$ conídios g^{-1} de grânulos). A necessidade de reaplicação de MS é de 6 meses, devido ao fato de produção continua de conídios por MS reidratado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Criação de insetos

3.1.1. Criação de *Spodoptera frugiperda*

A criação de *S. frugiperda* foi mantida em sala climatizada a 26±2 °C de temperatura, 70±10% de umidade relativa e 12 horas de fotofase no Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, Piracicaba-SP, Brasil. As lagartas da criação foram acondicionadas em copos plástico de 50 mL (4 cm de altura, 5 cm de diâmetro) vedados por disco de acrílico (5 cm de diâmetro). Cada copo plástico continha em torno de 200 lagartas alimentadas com dieta artificial segundo Greene, Leppla e Dickerson (1976). Pupas foram transferidas das placas de Petri de vidro (9 cm de diâmetro) e postas dentro de gaiolas confeccionadas com cano de PVC (policloreto de vinila) de 24 cm de altura e 14,5 cm de diâmetro, com placas de acrílico nas extremidades para evitar que os insetos adultos escapem. Adultos emergidos dentro das gaiolas foram alimentados com solução de mel a 10% embebida em algodão. As posturas dos adultos foram realizadas nas paredes da gaiola sobre papel tamanho A4 (210 × 297 mm), sendo o papel substituído diariamente. O papel contendo os ovos foi mantido em copos de plástico de 50 mL sobre papel filtro até a eclosão das lagartas. Lagartas recém-eclodidas foram transferidas para copos contendo dieta, como anteriormente descrito.

Para a realização de bioensaios, ovos provenientes da criação foram mantidos em potes de plástico de 500 mL e com papel filtro umedecido no fundo. Lagartas recém-eclodidas foram imediatamente alimentadas com fragmentos de folha de milho. Destaca-se que todas as lagartas utilizadas no presente trabalho foram exclusivamente alimentadas com dieta natural a base de folhas de milho não transgênico.

3.1.2. Criação de *Dalbulus maidis*

A criação de *D. maidis* foi mantida no Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, Piracicaba-SP, Brasil. A metodologia de criação consiste de cigarrinhas-do-milho em plantas de milho sem a doença do enfezamento, dentro de gaiolas em casa de vegetação (OLIVEIRA; LOPES; SILVA, 2017).

Plantas de milho em vaso foram mantidas dentro de gaiolas para alimentação dos adultos (5 a 6 dias após emergência) e realização das posturas endofíticas. Cada gaiola continha 5 vasos, sendo cada vaso com 3 a 4 plantas de milho (3 a 4 folhas expandidas). As plantas de milho foram oferecidas por período de 5 dias para oviposição e posteriormente colocadas em novas gaiolas até a eclosão das ninfas (15 dias em média). Plantas de milho foram substituídas conforme necessário para fornecimento de alimento para as ninfas. Os adultos emergidos foram mantidos em gaiolas separadas das ninfas e com plantas para realização da oviposição.

O ciclo de vida do inseto se completa em torno de 45 dias (ovo até adulto). As gaiolas (60 × 30 × 30 cm) possuem estrutura de plástico com 3 lados revestidos de voile para permitir ventilação e um único lado em material plástico transparente com porta fechada por zíper. Aspirador bucal foi utilizado para capturar os adultos.

3.2. Produção de microescleródios: Avaliação de 48 isolados de *Metarhizium* spp.

Foi realizado a produção de microescleródios de 48 isolados de *Metarhizium* da Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos "Prof. Sérgio Batista Alves" do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, Piracicaba - SP, Brasil (Tabela 1). Os isolados utilizados estão armazenados em fragmentos de 1 mm² de ágar em glicerol 10% a -80 °C. Dos 48 isolados, as espécies em estudo foram: 16 *Metarhizium anisopliae*, 16 *Metarhizium robertsii*, 8 isolados de *Metarhizium* sp. Indeterminada e 8 *Metarhizium humberi* sp. nov. As espécies Indeterminadas referidas como *Metarhizium* sp. Indeterminada 2 e 3 não podem ser agrupadas taxonomicamente dentro das espécies conhecidas de *Metarhizium* e estudos estão em andamento para identificação destas espécies. A espécie de *Metarhizium humberi*, anteriormente Indeterminada 1, foi recentemente classificada como espécie nova no gênero *Metarhizium* (LUZ et al., 2019). Os isolados utilizados foram previamente identificados através de técnicas moleculares.

Tabela 1. Relação de 48 isolados de *Metarhizium* utilizados para a produção de microescleródios.

Código do isolado	**Espécie**	**Origem (solo/inseto)**	**Local de coleta (cidade-estado)**
ESALQ1604	*Metarhizium anisopliae*	Biotech G	-
ESALQ1610	*Metarhizium anisopliae*	Banana	Sinop-MT
ESALQ1615	*Metarhizium anisopliae*	Vegetação Nativa	Sinop-MT
ESALQ1617	*Metarhizium anisopliae*	Vegetação Nativa	Delmiro Gouveia-AL
ESALQ1791	*Metarhizium anisopliae*	Palma	Delmiro Gouveia-AL
ESALQ1814	*Metarhizium anisopliae*	Vegetação Nativa	Delmiro Gouveia-AL
ESALQ1816	*Metarhizium anisopliae*	Vegetação Nativa	Delmiro Gouveia-AL
ESALQ1989	*Metarhizium anisopliae*	Cana-de-açúcar	Rio Verde-GO
ESALQ2787	*Metarhizium anisopliae*	Banana	Sinop-MT
ESALQ3167	*Metarhizium anisopliae*	Milho	Sinop-MT
ESALQ4090	*Metarhizium anisopliae*	Banana	Sinop-MT
ESALQ4133	*Metarhizium anisopliae*	Milho	Sinop-MT
ESALQ4258	*Metarhizium anisopliae*	Vegetação Nativa	Delmiro Gouveia-AL
ESALQ4676	*Metarhizium anisopliae*	Vegetação Nativa	Teotônio Vilela-AL
ESALQ4767	*Metarhizium anisopliae*	Vegetação Nativa	Teotônio Vilela-AL
ESALQ4797	*Metarhizium anisopliae*	Vegetação Nativa	Sinop-MT
ESALQ1621	*Metarhizium robertsii*	Milho	Sinop-MT
ESALQ1624	*Metarhizium robertsii*	Milho	Rio Verde-GO
ESALQ1890	*Metarhizium robertsii*	Milho	Sinop-MT
ESALQ1891	*Metarhizium robertsii*	Milho	Sinop-MT
ESALQ1952	*Metarhizium robertsii*	Milho	Rio Verde-GO
ESALQ2409	*Metarhizium robertsii*	Milho	Sinop-MT
ESALQ2412	*Metarhizium robertsii*	Milho	Sinop-MT
ESALQ2450	*Metarhizium robertsii*	Milho	Rio Verde-GO
ESALQ2559	*Metarhizium robertsii*	Milho	Rio Verde-GO
ESALQ2966	*Metarhizium robertsii*	Milho	Sinop-MT
ESALQ3165	*Metarhizium robertsii*	Milho	Sinop-MT
ESALQ3253	*Metarhizium robertsii*	Milho	Rio Verde-GO
ESALQ3348	*Metarhizium robertsii*	Milho	Sinop-MT
ESALQ4399	*Metarhizium robertsii*	Milho	Sinop-MT
ESALQ4406	*Metarhizium robertsii*	Milho	Sinop-MT
ESALQ4638	*Metarhizium robertsii*	Milho	Sinop-MT
ESALQ1608	*Metarhizium humberi* sp. nov.	Vegetação Nativa	Rio Verde-GO
ESALQ1637	*Metarhizium humberi* sp. nov.	Vegetação Nativa	Rio Verde-GO
ESALQ1638	*Metarhizium humberi* sp. nov.	Vegetação Nativa	Rio Verde-GO
ESALQ2048	*Metarhizium humberi* sp. nov.	Vegetação Nativa	Rio Verde-GO
ESALQ2474	*Metarhizium humberi* sp. nov.	Vegetação Nativa	Rio Verde-GO
ESALQ3715	*Metarhizium humberi* sp. nov.	Milho	Sinop-MT
ESALQ4376	*Metarhizium humberi* sp. nov.	Milho	Sinop-MT
ESALQ4637	*Metarhizium humberi* sp. nov.	Milho	Sinop-MT
ESALQ1636	*Metarhizium* sp. Indeterminada 2	Vegetação Nativa	Sinop-MT
ESALQ1660	*Metarhizium* sp. Indeterminada 3	Cana-de-açúcar	Iracemápolis-SP
ESALQ1684	*Metarhizium* sp. Indeterminada 3	Cana-de-açúcar	Iracemápolis-SP
ESALQ1686	*Metarhizium* sp. Indeterminada 3	Cana-de-açúcar	Iracemápolis-SP
ESALQ3240	*Metarhizium* sp. Indeterminada 3	Vegetação Nativa	Delmiro Gouveia-AL
ESALQ3947	*Metarhizium* sp. Indeterminada 3	Vegetação Nativa	Delmiro Gouveia-AL
ESALQ3988	*Metarhizium* sp. Indeterminada 3	Vegetação Nativa	Delmiro Gouveia-AL
ESALQ4684	*Metarhizium* sp. Indeterminada 3	Vegetação Nativa	Sinop-MT

O meio líquido utilizado como substrato para a fermentação foi o n°4 com relação C:N de 10:1 contendo por litro de água destilada: glucose (45,0 g); extrato de levedura (45,0 g); KH_2PO_4 (4,0 g); $CaCl_2.2H_2O$ (0,8 g); $MgSO_4.7H_2O$ (0,6 g); $FeSO_4.7H_2O$ (0,1 g); $CoCl_2.6H_2O$ (0,1 g); $MnSO_4.H_2O$ (16 mg); $ZnSO_4.7H_2O$ (14 mg); tiamina, riboflavina, pantotenato de Ca, niacina, piridoxamina, ácido tiótico (500 mg cada) e ácido fólico, biotina, vitamina B12 (50 mg cada) (JARONSKI; JACKSON, 2009). O meio de n° 4 foi previamente escolhido dentre os demais meios desenvolvidos por Jaronski e Jackson (2009) mediante ensaios preliminares (dados não apresentados) para maior produção de microescleródios. Nos ensaios preliminares para escolha do meio a ser utilizado no presente estudo, foi observado que a capacidade de formação de microescleródios é influenciada pela relação carbono e nitrogênio e pela fonte de nitrogênio utilizada. A utilização de extrato de levedura mostrou-se mais promissora à obtenção de microescleródios comparativamente com a caseína hidrolisada (resultados não publicados). A relação C:N foi calculada considerando que a glucose possui 40% de carbono e o extrato de levedura contém 8% de nitrogênio e 45% de carbono.

Suspensões de conídios utilizadas como inóculo para a fermentação líquida foram produzidas em meio composto de batata, dextrose e ágar (BDA, Difco®, Sparks, MD, USA) em placas de Petri (9 cm de diâmetro) incubados em câmaras tipo Biological Oxigen Demand (B.O.D.) a 25±1 °C e 12 horas de fotofase durante 10 dias. Cada suspensão de conídios foi preparada em 10 mL de água destilada estéril com espalhante adesivo Tween® 80 (0,05%).

O meio de cultura n° 4 (45 mL) foi então inoculado com 5 mL de suspensão de conídios ajustada para uma concentração final de 5×10^6 conídios mL^{-1} em frascos com defletores do tipo "baffled flasks" (250 mL) com três defletores na base (Glass, Bellco®, Vineland, NJ, USA). Os frascos contendo meio inoculado com fungo permaneceram em mesa orbital tipo Shaker (MARCONI®, Modelo: MA 830) a 300 rpm, 28±2 °C de temperatura, 12 horas de fotofase durante 4 dias. O período de fermentação de 4 dias foi escolhido baseado em estudos de Jackson e Jaronski (2012) que revelaram não haver diferença na produção de MS entre o quarto e sétimo dia de fermentação para *M. brunneum* cultivado em bioreatores de 100 L com relação C:N de 30:1. Diariamente os frascos foram agitados manualmente para retirada de micélios aderidos na parede dos frascos. Foram realizadas 3 repetições em tempos diferentes com 2 replicatas para cada isolado (n=6). Cada replicata foi representada por um frasco.

A quantificação da concentração de MS foi realizada diariamente durante os 4 dias de fermentação. Para tanto, uma alíquota de 1 mL foi retirada do meio inoculado seguido de diluição em 9 mL de água + Tween® 80 (0,05%). Dos 10 mL de suspensão foi retirada uma alíquota de 100 µL e colocada em lâminas de vidro (25×75 mm) para a contagem de todos os

microescleródios na lâmina com o auxílio de microscópio de luz no aumento de 10 vezes. Estruturas de hifas enoveladas, pigmentadas e maiores que 50 µm de diâmetro foram contabilizadas como microescleródios (JACKSON; JARONSKI, 2009).

3.3. Produção de microescleródios de três isolados selecionados de *Metarhizium* spp.

Com base nos resultados de produção de microescleródio dos 48 isolados, foram selecionados 3 isolado de espécies diferentes para utilização nos bioensaios de tratamento de semente de milho. Estes isolados são: *Metarhizium anisopliae* ESALQ1814, *Metarhizium robertsii* ESALQ2450 e *Metarhizium humberi* ESALQ1638. A metodologia adotada para a produção de MS dos 3 isolados foi idêntica a utilizada na produção dos 48 isolados (seção 3.2.).

A produção de MS e blastosporo dos três isolados foram estimadas diariamente. A concentração de MS foi estimada segundo metodologia utilizada com os 48 isolados. Os blastosporos foram contabilizados a partir de diluição em série de solução de 10 mL contendo 1 mL de meio inoculado e 9 mL de solução estéril de Tween® 80 (0,05%). A contagem de blastosporos foi realizada com o auxilio de câmara de Neubauer e microscópio de luz (DM4000B, Leica® Microsystems, Wetzlar, Germany).

Ao quarto dia de fermentação foi adicionado 5% (peso/volume) de terra de diatomácea (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO) nos meios líquidos, segundo metodologia adaptada de Jackson e Jaronski (2009). A massa formada de meio líquido com microescleródios e terra de diatomácea (MS-TD) foi filtrada a vácuo em funil de Buchner e frasco Kitassato em discos de papel filtro de 70 mm de diâmetro (Unifil, Brasil). O material filtrado foi colocado em placa de Petri (9 cm de diâmetro) e transferido para câmara de secagem a 50±5% de umidade relativa, 25 °C por 2 dias ou até atingir atividade de água (a_w) igual ou inferior a 0,3 medido através de instrumento Labmaster-aw, Novasina®, Lachen SZ, Switzerland. Posteriormente as amostras foram embaladas a vácuo e pesadas em balança analítica para estimar a produção em gramas de MS-TD por litro de meio. As amostras foram armazenadas em sacos de polietileno a 4±2 °C.

A viabilidade de MS e a concentração de conídios produzidos por MS dos 3 isolados selecionados foi realizada com a inoculação de grânulos de MS-TD (25 mg) em superfície ágar-água a 2% em placas de Petri e incubadas a 28±2 °C. O ágar-água foi preparado com adição de 20 g de ágar em 1 L de água destilada seguido de esterilização em autoclave. A viabilidade de MS foi obtida após 24 horas de incubação das placas pela contagem de estruturas germinadas em microscópio a partir das 100 primeiras estruturas de MS encontradas aleatoriamente em cada

placa. As mesmas placas foram mantidas incubadas por 7 dias a 26±2 °C para determinação de produção de conídios (conídios g^{-1} de MS+TD) pela contagem do total de conídios. Foram adicionados 10 mL de solução de Tween® 80 (0,1%) ao conteúdo de cada placa com ágar-água incubada a 7 dias. Por meio de diluições foram quantificados os conídios em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio de luz. Cada amostra de isolado de *Metarhizium* foi representada por uma placa de Petri.

3.4. Colonização endofítica, densidade de *Metarhizium* spp. no solo e promoção de crescimento de plantas de milho inoculadas via semente

Sementes de milho (híbrido simples Fórmula®, Syngenta, Brasil) foram recobertas por grânulos de MS-TD de um dos 3 isolados de *Metarhizium*. A quantidade em gramas de MS-TD por semente de milho foi ajustada considerando uma provável esporulação destes gerando 10^{12} conídios por hectare segundo dados obtidos de cada amostra quanto a viabilidade e produção de conídios por MS. Juntamente com o MS-TD, foi adicionado hidrogel STOCKOSORB® 660 (Evonik, Alemanha) segundo recomendações do produto (400 g de hidrogel para 100 kg de sementes). O hidrogel foi adicionado com a função de reter água e contribuir com a aderência do MS-TD na superfície da semente. Para tanto, a mistura com hidrogel foi hidratada o suficiente para aderir às sementes. No tratamento controle foram utilizadas sementes inoculadas apenas com hidrogel.

As sementes de milho foram esterilizadas antes da inoculação com 70% de etanol por 2 minutos, seguidos de 3 minutos em 1,5% de hipoclorito de sódio (Água sanitária Super Candida, 2 a 2,5% de cloro ativo), 2 minutos em etanol 70% e tríplice passagem em água destilada estéril (AKUTSE et al., 2013). A água do último enxágue foi plaqueada em BDA para averiguar a eficiência do procedimento de esterilização superficial das sementes (SCHULZ et al., 1998).

Para confirmar a eficiência da inoculação estimou-se a produção de conídios na superfície de sementes inoculadas. Sementes foram mantidas sobre meio seletivo em placas de Petri (9 cm de diâmetro) e incubadas a 28±2 °C por 7 dias. O meio seletivo é composto por BDA (39 g), ciclohexamida (0,5 g), cloranfenicol (0,2g), dodine 65% (0,5 g), cristal violeta (10 mg) por litro de água destilada e estéril. Foram utilizadas três sementes por placa e três placas por tratamento. No sétimo dia todas as sementes foram individualmente imersas em 10 mL de solução de água destilada com Tween® 80 (0,1%). Cada semente com o meio contendo o fungo ao redor foi transferida para solução de água+Tween® 80 e após agitação em Vórtex (IKA, Brasil,

Modelo: Vortex Genius 3) obteve-se suspensão de conídios. Conídios foram contabilizados com o auxilio de câmara de Neubauer e microscópio de luz em 40× de aumento.

A capacidade do fungo colonizar endofíticamente as plantas de milho foi avaliada pelo plaqueamento de fragmentos de raiz e folha em placas de Petri sobre meio de cultura seletivo de parte das plantas do experimento com os insetos cultivadas em vasos na mesma casa de vegetação (ARAÚJO et al., 2002). Os fragmentos foram obtidos de plantas de milho (3 folhas expandidas) previamente inoculadas por tratamento de sementes com microescleródios de *Metarhizium* (ESALQ1814, ESALQ2450, ESALQ1638) e do controle. Os fragmentos foram lavados em água corrente para remover partículas de solo e esterilizados por submersão em álcool 70% por 2 minutos, em hipoclorito de sódio a 1,5% por 3 minutos, seguido de álcool 70% por 2 minutos e tríplice passagem em água destilada estéril. Os fragmentos de raízes e folhas foram plaqueados em meio de cultura seletivo a *Metarhizium*. As placas de Petri foram incubadas a 25±2 °C e 14 horas de fotofase por até 20 dias (BEHIE; JONES; BIDOCHKA, 2015).

As colônias foram identificadas visualmente com base em características morfológicas para confirmação da colonização de *Metarhizium*. Para a confirmação da colonização dos fungos foram preparadas lâminas para verificação em microscópio óptico. A porcentagem de recuperação (PR) foi dada pela razão entre o número de fragmentos que apresentarem crescimento do fungo *Metarhizium* e o número total de fragmentos inoculados.

A promoção de crescimento associada à presença do fungo em plantas de milho foi avaliada pela medição da área foliar, altura da parte aérea, comprimento da raiz e peso fresco e seco das partes aérea e radicular das plantas aos 30 dias após semeadura. Adicionalmente a área foliar e altura da parte aérea das plantas foram mensuradas também aos 15 dias após a semeadura. O cálculo da área foliar foi realizado com a multiplicação do comprimento pela largura da mesma folha, seguido de multiplicação de um fator de 0,77 para o ajuste (FRANCIS et al., 1969). O método de medir as folhas foi escolhido por ser simples e não destrutivo as plantas. Foi considerada a altura da parte aérea das plantas do início do hipocótilo, região logo acima da semente, até o ponto mais distante da última folha expandida. Todas as medidas foram realizadas com o auxilio de uma régua milimetrada. A área foliar foi mensurada em 5 plantas de cada tratamento em três vezes no tempo.

Foi mensurado o peso fresco e seco de plantas aos 30 dias após a semeadura. Foram utilizadas 5 plantas de cada tratamento em duas repetições no tempo. Para a obtenção de peso fresco e seco foi realizado primeiramente a remoção dessas plantas dos vasos contendo substrato seguido do transporte das amostras para o laboratório. Todo o substrato envolvendo as raízes foi retirado com água corrente. Foi realizado um corte na região acima da primeira raiz de cada

planta seguido de pesagem em balança de precisão para obtenção de peso fresco. Posteriormente, os fragmentos das plantas foram acondicionados em sacos de papel (13×18 cm) e transferidos à estufa a 60 °C por 24 horas ou até obtenção de peso constante o qual foi considerado o peso seco da amostra.

A presença de *Metarhizium* no solo onde as sementes tratadas por *Metarhizium* spp. foram semeadas foi avaliada por contagens do número de unidades formadora de colônias (UFC) em meio seletivo. A avaliação foi realizada ao final do experimento, ou seja, 30 dias após o plantio. A metodologia utilizada foi uma adaptação segundo Behle e Jackson (2014). Amostras de solo foram coletadas próximas as raízes das plantas de milho com o auxílio de uma espátula previamente flambada para assepsia. As amostras de solo (1 g) foram diluídas serialmente 3 vezes em água destilada estéril (obtendo-se 10 mL por diluição) contendo espalhante adesivo Tween® (0,05%). Cada diluição foi representada por uma alíquota de 20 µL inoculada em placa de Petri e mantida a 26±2 °C, 12 horas de fotofase por 7 dias. A UFC foi estimada pela contagem das colônias formadas sobre o meio seletivo.

3.5. Eficácia no controle de *Dalbulus maidis* e *Spodoptera frugiperda* em plantas inoculadas por *Metarhizium* spp.

A sobrevivência de *D. maidis* e *S. frugiperda* em plantas inoculadas via semente com microescleródios de um dos 3 isolados de *Metarhizium* (ESALQ1814, ESALQ2450 e ESALQ1638) foi avaliada. No controle, foram utilizadas plantas não inoculadas. As plantas foram então infestadas com uma das duas espécies de insetos em estudo. O conjunto formado por planta e insetos foram confinados em gaiolas com formato cilíndrico confeccionadas por material acrílico transparente (21 cm de altura e 8 cm diâmetro) vedadas por voile na extremidade superior e pelo próprio substrato suporte da planta na extremidade inferior. As plantas de milho foram cultivadas em vasos de plástico (500 mL) em solo não autoclavado + substrato comercial (Tropstrato HT, Vida Verde, Mogi Mirim, Brasil) (1:1) em sala climatizada a 25±5 °C e 12 horas de fotofase.

Plantas com 2 a 3 folhas expandidas foram infestadas por lagartas com um dia após atingir o terceiro ínstar criadas em dieta natural à base de folha de milho. Foram 20 repetições (plantas) por tratamento com 2 lagartas por planta (n=40). O número maior de plantas utilizadas nos tratamentos com lagartas justifica-se pela necessidade de maior área foliar e devido ao hábito canibal. Foram utilizadas 2 sementes por vaso para posterior desbaste e cultivo de apenas 1 planta. A mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* foi avaliada diariamente por 7 dias. Para

confirmação de morte por colonização de *Metarhizium* os cadáveres das lagartas mortas durante o bioensaio foram transferidos e individualizados em placas de Elisa com 24 compartimentos (poços) contendo algodão úmido entre os compartimentos para proporcionar umidade para esporulação do fungo. Foram realizadas 2 repetições temporais.

Dez adultos de cigarrinha-do-milho com 5 dias após a emergência e não sexados foram confinados em cada gaiola contendo uma planta de milho (2 a 3 folhas expandidas) previamente inoculadas por cada tratamento. Foram utilizadas 5 repetições por tratamento (n=50). A mortalidade foi avaliada a cada 48 horas durante 10 dias. Foram 4 tratamentos (ESALQ1814, ESALQ2450, ESALQ1638 e controle) e 4 repetições temporais.

3.6. Análise Estatística

A produção de *Metarhizium* spp. (microescleródios, blastospores e conídios) foi analisado por modelo linear generalizado (GLM) com distribuição binomial negativa, pois se refere a dados de contagem. A análise dos dados de viabilidade de microescleródios foi ajustada a um modelo linear generalizado misto com distribuição logística-normal e efeito aleatório para a variável observacional. A qualidade do ajuste do modelo foi avaliada através da análise gráfica de resíduos usando o pacote "hnp" (MORAL; HINDE; DEMÉTRIO, 2017) juntamente com o critério de informação de Akaike (AIC), sendo AIC menor um indicativo de melhor ajuste. A comparação múltipla de médias foi baseada no método de Tukey HSD a 5% de significância usando o pacote "emmeans" (LENTH, 2018).

Os dados de peso das plantas de milho foram analisados através de *one-way* ANOVA usando um modelo linear misto com distribuição normal. Diferenças significativas entre médias foram determinadas por um teste de comparação múltipla baseado em contrastes pelo método de Tukey HSD a 5% de significância.

Os dados de mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* após 7 dias sobre plantas de milho foram ajustados a um modelo linear generalizado misto com distribuição binomial e função logit link. As médias de mortalidade de lagartas foram separadas pelo teste de contraste de Tukey HSD a 5% de significância. A estimativa do tempo letal mediano (TL_{50}) das lagartas foi analisada pelo modelo Weibull. Enquanto isso, os dados de sobrevivência de *D. maidis* foram coletados durante 10 dias de infestação e analisados pelo método de Kaplan-Meier seguido do teste de log-rank com 5% de significância. As curvas de sobrevivência foram comparadas entre si com base no teste da razão log-verossimilhança com 5% de significância. No presente trabalho, as análises foram realizadas em ambiente estatístico do software R (R CORE TEAM, 2018).

4. RESULTADOS

4.1. Seleção de isolados *Metarhizium* spp. para produção de microescleródios

No cultivo dos 48 isolados de *Metarhizium* spp. foi observada produção de microescleródios por todos os isolados submetidos à fermentação ($F = 7{,}19$; $df = 47, 240$; $p < 0.0001$). A concentração de MS produzidos pelos 48 isolados no quarto e último dia de fermentação variou entre $1{,}3\times10^2$ e $2{,}9\times10^3$ MS mL^{-1}. A pigmentação dos microescleródios foi crescente durante os 4 dias de fermentação e com eventual formação de conídios nas paredes dos frascos no terceiro e quarto dia (esporulação de conídios formando manchas de coloração verde no interior do frasco). Além da formação de microescleródios, houve formação de blastosporos e estruturas enoveladas de hifa (hifas não completamente compactadas e pouco pigmentadas em relação aos microescleródios).

Dentre os 16 isolados de *Metarhizium anisopliae* destaca-se o isolado ESALQ1814 com produção de $1{,}43\times10^3$ MS mL^{-1}. *Metarhizium anisopliae* ESALQ1814 além da alta produção de MS apresentou desenvolvimento de muitas hifas enoveladas. A alta formação de enovelados de hifas indica que o potencial de produção de microescleródios poderia ser maior com devidas adaptações ao cultivo do fungo ESALQ1814. Dentre os isolados com as menores produções de microescleródios da espécie *M. anisopliae* está ESALQ4797 ($1{,}7\times10^2$ MS mL^{-1}). Os 16 isolados de *M. robertsii* em estudo, produziram entre $2{,}7\times10^2$ (ESALQ1624 e ESALQ2559) e $9{,}3\times10^2$ MS mL^{-1} (ESALQ2450). Dos isolados de *Metarhizium* sp. Indeterminada destaca-se o isolado ESALQ1636 como um dos mais produtivos ($1{,}6\times10^3$ MS mL^{-1}). Já o isolado ESALQ4684 de *Metarhizium* sp. Indeterminada foi um dos menos produtivos ($1{,}3\times10^2$ MS mL^{-1}), dos 48 isolados em estudo. O isolado de *M. humberi* sp. nov. ESALQ1638 destacou-se com alta produção de microescleródios ($2{,}9\times10^3$ MS mL^{-1}), dentre os 48 isolados em estudo (Figura 1).

Baseado nas médias de produção de microescleródios dos 48 isolados de *Metarhizium*, somente três isolados, de diferentes espécies e com alta produção de MS, foram escolhidos para os estudos de inoculação de sementes de milho. Os isolados escolhidos foram: *M. humberi* sp. nov. ESALQ1638, *M. anisopliae* ESALQ1814 e *M. robertsii* ESALQ2450.

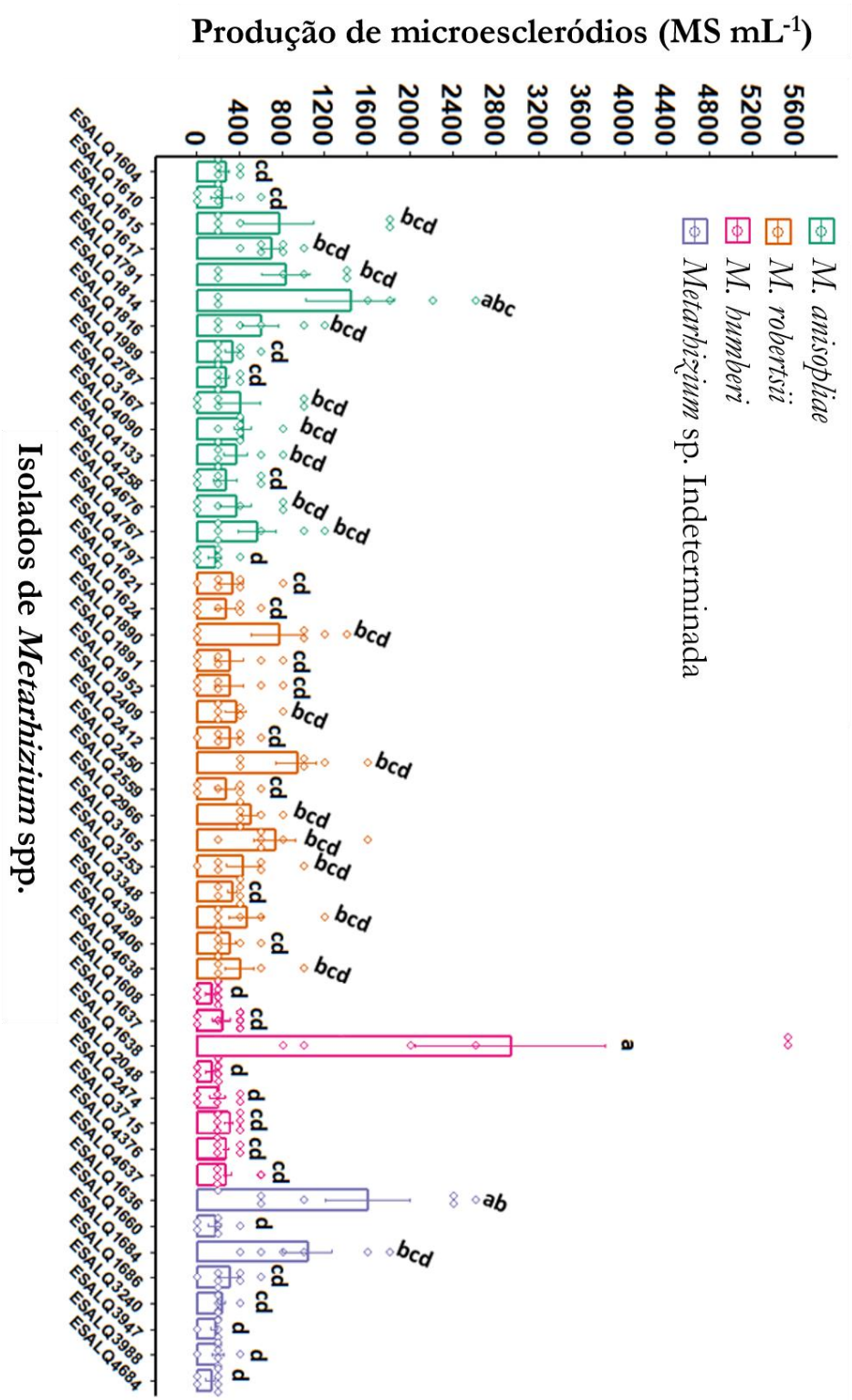
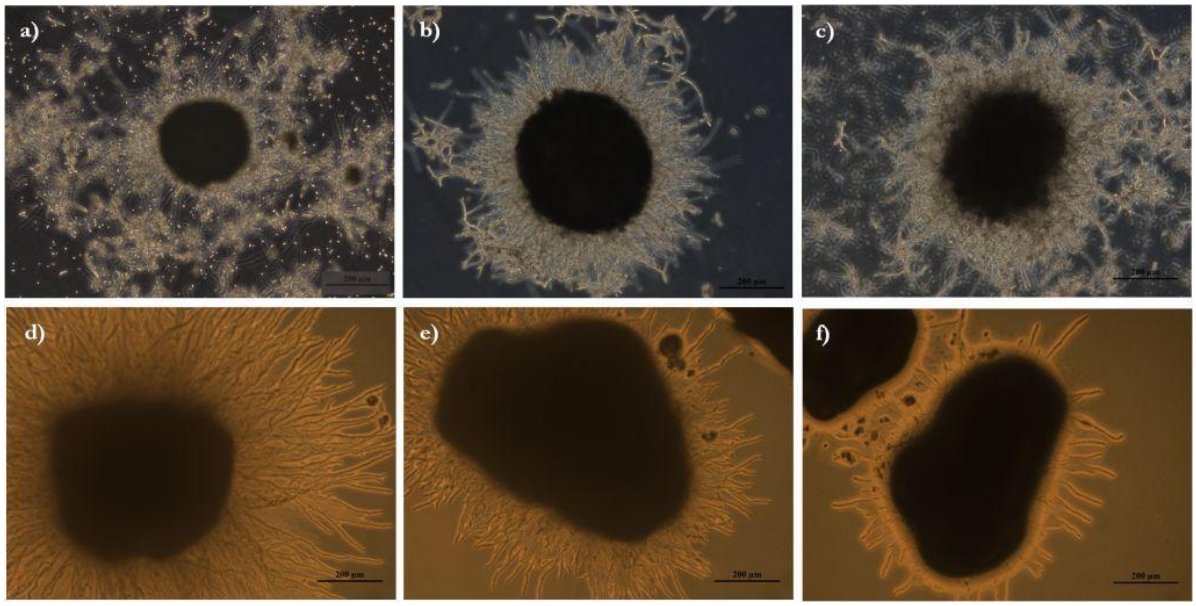


Figura 1. Produção de microescleródios de *Metarhizium* spp. (MS mL^{-1}) no quarto dia de fermentação no meio de cultura líquido número 4 a 28±2 °C, 20±10% de umidade relativa, 12 horas de fotofase e 300 rpm. Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativas pelo teste Tukey.

4.2. Desempenho dos isolados selecionados de *Metarhizium* spp.

A produção de microescleródios dos isolados *M. anisopliae* ESALQ1814, *M. robertsii* ESALQ2450 e *M. humberi* sp. nov. ESALQ1638, foi respectivamente de $1,2\times10^3$, $1,8\times10^3$ e $3,6\times10^3$ microescleródios mL^{-1}. A germinação (formação de hifas a partir dos MS), desses grânulos de MS foi acima de 90%, após incubação dos grânulos sobre superfície ágar-água por 24 horas e a 28±2 °C. A concentração de conídio formados a partir dos microescleródios germinados foi superior a $7,2\times10^8$ conídios g^{-1} de MS estabilizado, após reidratação em superfície ágar-água por 7 dias e a 28±2 °C (Figura 2).

Figura 2. Microescleródios no quarto dia de fermentação líquida de *Metarhizium humberi* ESALQ1638(a), *Metarhizium anisopliae* ESALQ1814 (b) e *Metarhizium robertsii* ESALQ2450(c). Microescleródios de *Metarhizium humberi* ESALQ1638(d), *Metarhizium anisopliae* ESALQ1617 (e) e *Metarhizium robertsii* ESALQ2450 (f) germinando após 24 horas sobre superfície ágar-água a 2% a 28±2 °C e 12 horas de fotofase.



Houve formação de blastosporos concomitantemente a produção de microescleródios de *Metarhizium* durante os 4 dias de fermentação no mesmo meio de cultura líquida. Os maiores valores de produção de blastosporos coincidem com as maiores produções de MS do mesmo frasco de fermentação. As maiores produções de blastosporos ($5,8\times10^7$ blastosporos mL^{-1}) e MS foram observadas para o isolado ESALQ1638 (Tabela 2).

Tabela 2. Produção de microescleródios (MS) e blastosporos em meio líquido e viabilidade e produção de conídios por grama de MS seco de três isolados de *Metarhizium* spp.

Isolado de *Metarhizium*	Produção de MS ($\times 10^3$MS mL^{-1})	Viabilidade de MS (%)	Produção de conídios por g de MS seco ($\times 10^9$)	Produção de blastosporos ($\times 10^7$ mL^{-1})
M. humberi ESALQ1638	3,6± 0,7^a	93,0 ± 1,0^{ns}	6,7 ± 3,4^a	5,8 ± 0,9^a
M. anisopliae ESALQ1814	1,2 ± 0,3^b	94,0 ± 2,0	1,7 ± 0,9^b	0,4 ± 0,07^b
M. robertsii ESALQ2450	1,8 ± 0,4^{ab}	96,0 ± 1,0	0,7 ± 0,1^b	4,2 ± 1,6^a
Deviance (χ^2)	10,299	4,526	15,146	30,868
df	2, 24	2, 24	2, 24	2, 24
p-valor	0,0058	0,104	0,0005142	1,982e-07
Modelo ajustado	BN	NB	BN	BN

Média (±EP), letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p<0,05$). ^{ns} sem diferença significativa. BN = Binomial Negativo. NB = Normal Binomial.

A necessidade de aplicação de MS por hectare foi estimada com base na viabilidade e produção de conídios por microescleródios sobre ágar-água. Considerando a recomendação de aplicação de 10^{12} conídios por hectare para a cultura do milho foi calculada a necessária aplicação de 150 g, 597 g e 1,4 kg de grânulos de MS por hectare dos isolados *M. humberi* ESALQ1638, *M. anisopliae* ESALQ1814 e *M. robertsii* ESALQ2450, respectivamente.

4.3. Colonização endofítica, densidade de *Metarhizium* spp. no solo e promoção de crescimento das plantas de milho inoculadas

A densidade de *Metarhizium* no solo medida pela densidade de unidades formadoras de colônias (UFC) foi significativamente maior (χ^2=34,87, df=2, 27, p < 0,0001) para os tratamentos com isolados ESALQ2450 ($1,2\times10^5$ UFC g^{-1} de solo) e ESALQ1814 ($8,0\times10^4$ UFC g^{-1} de solo) do que para o tratamento com ESALQ1638 ($9,7\times10^3$ UFC g^{-1} de solo) (Figura 3). Nos tratamentos com solo não inoculado por *Metarhizium* não foi observada formação de colônia do fungo. A produção de conídios por sementes de milho inoculadas por MS após 7 dias sobre superfície de meio seletivo a *Metarhizium,* revelou uma maior quantidade de conídios produzidos nas sementes inoculadas por ESALQ1638 (χ^2=9,26, df=2, 6, p = 0,0238). A concentração média foi de $7,0\pm1,0\times10^6$, $1,5\pm0,8\times10^7$, e $1,7\pm7,6\times10^7$ conídios por semente para *M. robertsii* ESALQ2450, *M. anisopliae* ESALQ1814 e *M. humberi* ESALQ1638, respectivamente.

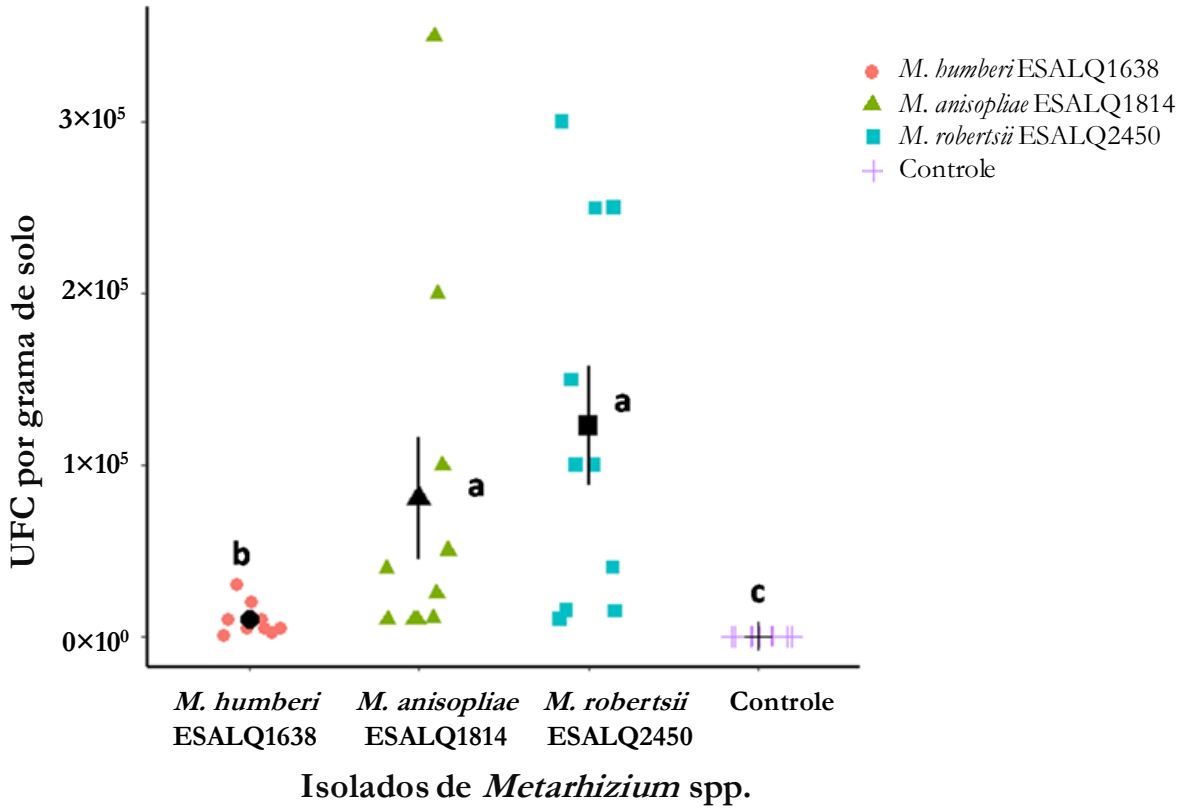


Figura 3. Unidades formadoras de colônia (UFC) de *Metarhizium* spp. em solo inoculado e não inoculado através do tratamento de sementes de milho. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Não foi observada colonização dos fungos *Metarhizium* spp. (ESALQ1814, ESALQ2450 e ESALQ1638) nas plantas de milho tratadas via semente. Fragmentos de raiz e folha de milho de todos os tratamentos foram mantidas sobre meio seletivo por 20 dias sem a formação de colônias que caracterizem *Metarhizium*. Entretanto, as plantas de milho inoculadas por microescleródios de *Metarhizium* (ESALQ1814, ESALQ2450 e ESALQ1638) apresentaram em geral maiores crescimentos medido pela área foliar, comprimento de raiz, porte da planta e peso seco.

Após 15 dias da semeadura (DAS) as plantas inoculadas com *M. anisopliae* apresentaram área foliar superior ao controle não inoculado, não diferindo dos demais fungos. A altura das plantas inoculadas com *Metarhizium humberi* e *M. robertsii* foram superiores ao controle, não diferindo de *M. anisopliae* (Figura 4).

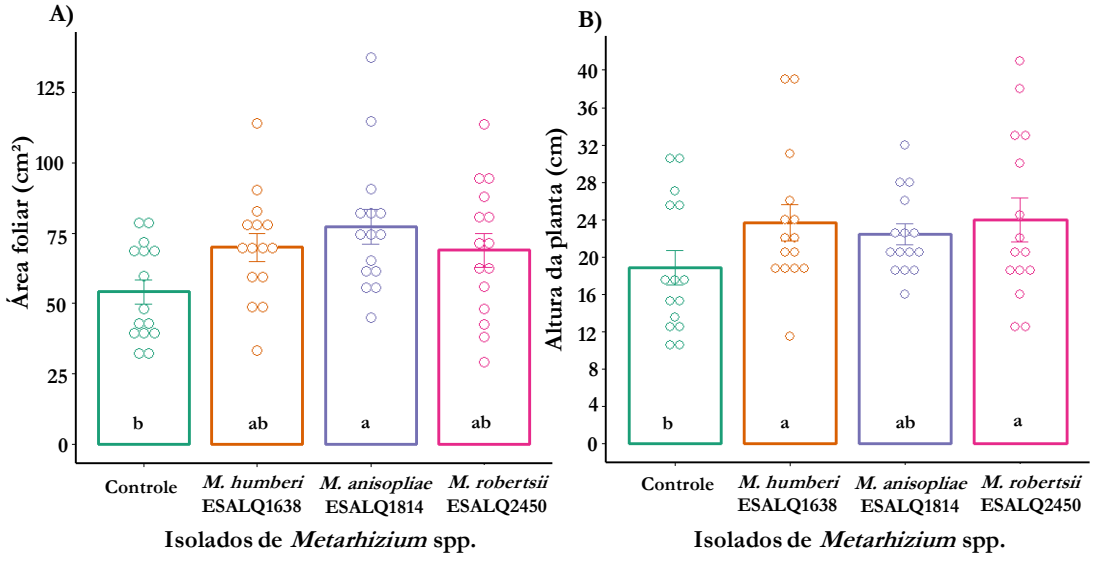


Figura 4. Área foliar (A) e altura de plantas (B) de milho inoculadas por *M. humberi* ESALQ1638, *M. anisopliae* ESALQ1814 e *M. robertsii* ESALQ2450 via tratamento de semente após 15 dias de semeadura em casa de vegetação. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($p<0,05$) pelo teste de Tukey.

Após 30 dias as plantas de milho inoculadas com ESALQ1638 apresentaram maior altura ($p<0,001$) e comprimento de raíz ($p=0,003$) do que os demais tratamentos. O comprimento de raíz do tratamento com inoculação de ESALQ2450 foi estatisticamente similar ao ESALQ1638 e ao controle. A área foliar aos 30 DAS não foi significativamente diferente entre os tratamentos ($p=0,082$).

Com relação ao peso seco das raízes houve diferença significativa entre os tratamentos sendo o maior peso observado em plantas inoculadas por ESALQ2450 ($p=0,005$). O peso seco das folhas foi superior nas plantas inoculadas por microescleródios de ESALQ1814 em relação ao controle não inoculadas ($p=0,024$). Com relação ao peso seco de planta inteira as tratadas pelos fungos *M. anisopliae* ESALQ1814, *M. robertsii* ESALQ2450 apresentaram maior peso seco que o controle ($p=0,002$), não havendo diferenças entre os tratamentos com fungos (Figura 5).

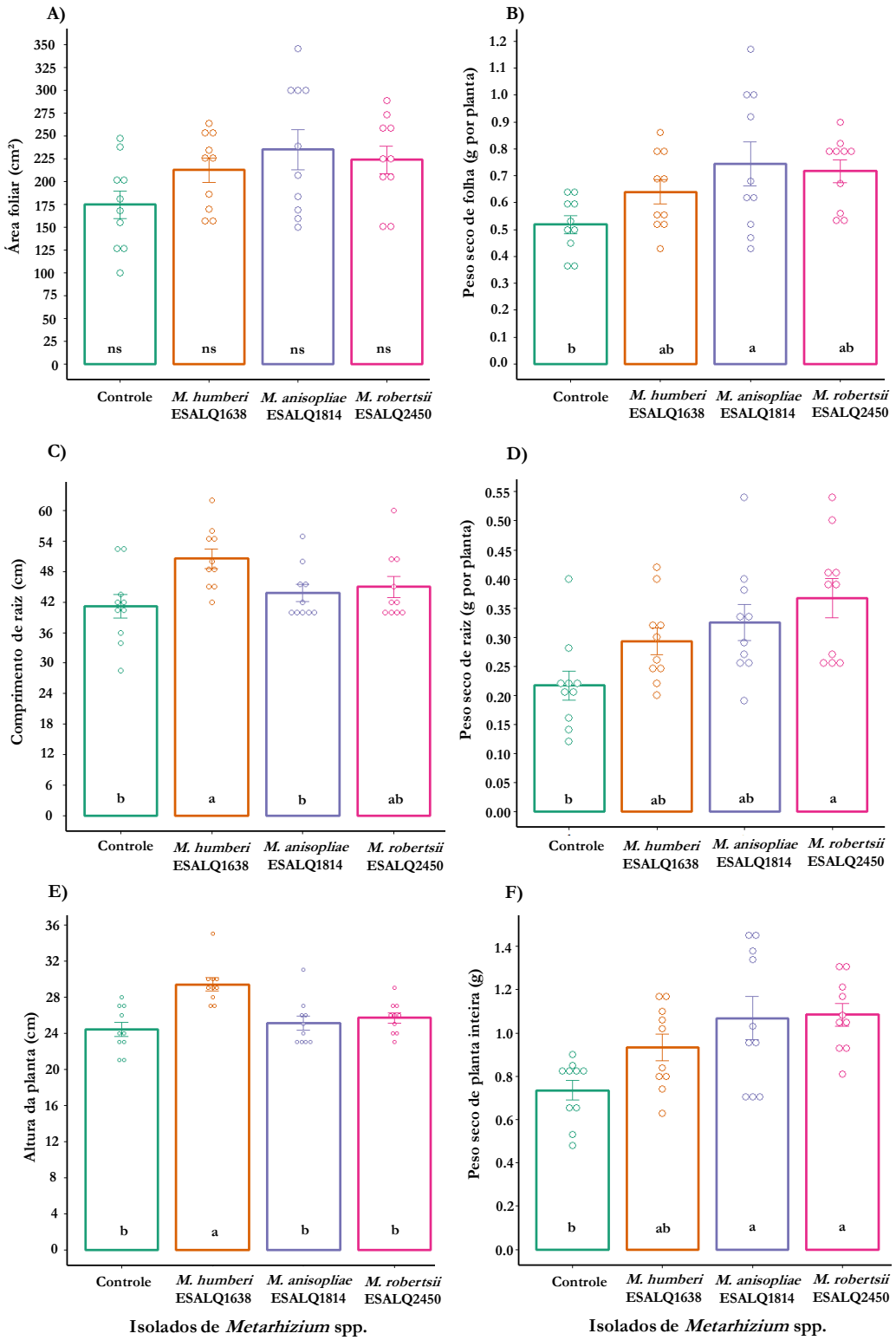


Figura 5. Área foliar, comprimento de raiz, altura de planta e pesos seco de folha, de raiz e de plantas inteiras de milho (A-F) inoculadas com *Metarhizium humberi* ESALQ1638, *Metarhizium anisopliae* ESALQ1814 e *Metarhizium robertsii* ESALQ2450 via tratamento de sementes após 30 dias de semeadura em casa de vegetação. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes ($p<0,05$) pelo teste de Tukey.

4.4. Eficácia de microescleródios de *Metarhizium* spp. no controle de *Dalbulus maidis* e *Spodoptera frugiperda*

Adultos de *Dalbulus maidis* e lagartas de 3° instar de *Spodoptera frugiperda* foram alimentados com plantas de milho inoculadas via tratamento de semente com microescleródios de *Metarhizium*: ESALQ1814, ESALQ2450 e ESALQ1638. A sobrevivência de adultos de *D. maidis* não foi afetada pela inoculação dos fungos nas plantas de milho ($\chi2$ = 0,67, df = 3, p = 0,90). Por outro lado, a inoculação de plantas por *Metarhizium* resultou em aumento da mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* ($\chi2$ = 27,5, df = 3, p<0,05) (Figura 6). Lagartas alimentadas por plantas inoculadas via semente por uma das 3 espécies de *Metarhizium* apresentaram valores de sobrevivência entre 36,2 e 45,0% e tempo letal mediano (TL_{50}) entre 5 e 6 dias enquanto que no tratamento controle a sobrevivência foi acima de 70% e TL_{50} de 12 dias foram significativamente menor do que nos tratamentos com aplicação fúngica (Tabela 3). Não houve diferença estatística da sobrevivência das lagartas entre os três tratamentos inoculados com espécies de *Metarhizium*. Os cadáveres de lagartas foram transferidos para câmara úmida e após 7-10 dias não apresentaram crescimento de esporulação de *Metarhizium*. Foram preparadas lâminas contendo fragmentos de lagartas mortas de todos os quatro tratamentos, porém foi observada apenas a presença de propágulos do fungo *Penicillium*.

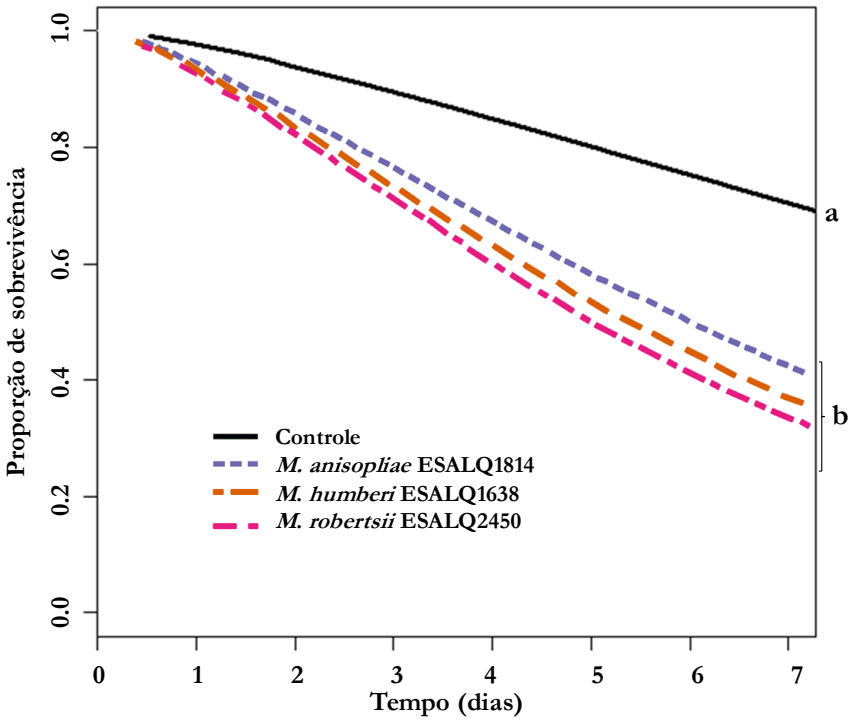


Figura 6. Sobrevivência de lagartas de 3° ínstar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com plantas de milho inoculadas por *Metarhizium* spp. via tratamento de sementes a 25±5 °C e fotofase de 12 horas.

Tabela 3. Tempo Letal mediano (TL_{50}) estimado e mortalidade de lagartas de terceiro ínstar de *Spodoptera frugiperda* após sete dias sobre plantas de milho originarias de sementes inoculadas por microescleródios de *Metarhizium* spp.

Isolado	TL_{50} (dias)	Limite de confiança de 95% (dias)		Sobrevivência após 7 dias (%)	Limite de confiança de 95% (dias)	
		Abaixo	Acima		Abaixo	Acima
Controle	11,48[a]	8,47	15,72	71,3[a]	62,1	81,9
M. humberi ESALQ1638	5,37[b]	4,35	6,58	40,0[b]	30,6	52,3
M. anisopliae ESALQ1814	6,00[b]	4,85	7,44	45,0[b]	35,3	57,3
M. robertsii ESALQ2450	5,01[b]	4,07	6,12	36,2[b]	27,1	48,5

Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença estatística por teste de Tukey HSD (p <0,05).

5. DISCUSSÕES

Um ponto chave para garantir o sucesso na utilização de microescleródios é a produção em escala desses propágulos por fermentação líquida submersa. Para escolher o meio de cultura ideal foram realizados testes preliminares que detectaram diferença na produção de microescleródios ao cultivar isolados de *Metarhizium* em sete combinações dos meios de cultura líquido desenvolvidos por Jaronski e Jackson (2009), diferindo na relação carbono e nitrogênio (C:N). Além da relação C:N, verificou-se que a produção de microescleródios é dependente da fonte de nitrogênio. A produção de estruturas de resistência no meio de cultura número 4 (relação C:N de 10:1) contendo extrato de levedura foi da ordem de 10 vezes maior do que a produção no meio de cultura número 5 (relação C:N de 30:1). A maior produção de microescleródios em meio com relação C:N de 10:1 pode estar relacionada com a maior necessidade de nitrogênio dos isolados em estudo. Estudos mostram que meio de cultura mais rico em nitrogênio (30:1 em relação a 50:1 de C:N) proporcionaram maior eficiência em alguns parâmetros como: a produção de microescleródios, a produção de conídios por grama de microescleródios estabilizado e a virulência a insetos (BEHLE; JACKSON, 2014). Além disso, a concentração dos componentes que contêm o meio de cultura líquido está intimamente relacionada com a produção de propágulos como blastosporos e microescleródios do mesmo isolado fúngico (YPSILOS; MAGAN, 2005; JARONSKI; MASCARIN, 2017).

Importante requisito na escolha do isolado fúngico para o controle de pragas é a capacidade e a facilidade de produção. Todos os 48 isolados de *Metarhizium* em estudo foram capazes de produzir microescleródios, e as diferenças de produção entre os isolados não foi superior a 22 vezes. Durante a produção de microescleródios houve também produção de blastosporos de *Metarhizium*. A utilização de microescleródios e blastosporos conjuntamente poderia contribuir para maior quantidade de propágulos no solo e contribuir para o controle biológico de pragas. Contudo, os blastosporos devem apresentar uma curta sobrevivência no solo comparado aos microescleródios. No presente estudo, não foram incluídos blastosporos nos tratamentos de sementes já que quase todos devem ter sido eliminados pelo tamanho do filtro usado na separação dos microescleródios que são maiores e os blastosporos remanescentes devem ter sido inviabilizados pelo método de secagem usado, já que estes são menos resistentes a secagem.

A produção de microescleródios tem grande importância no controle de pragas quando estes resultam em elevada formação de conídios infectivos no ambiente, diferentemente do uso no tratamento de sementes como inoculante já que o que se espera é a colonização das plantas e

do solo. A viabilidade e quantidade de conídios produzidos pelos microescleródios é um parâmetro importante. Foi verificada alta viabilidade (acima de 90%) e a capacidade dos propágulos de microescleródios germinarem com a formação de hifas e posteriormente a formação de conídios em volta das estruturas de resistência para os três isolados mais produtivos dos 48 isolados em estudo: ESALQ1814, ESALQ2450 e ESALQ1638. Segundo Behle e Jackson (2014), a produção de conídios proveniente de microescleródios está relacionada com o meio de cultura utilizado; e corroborando os resultados de nosso estudo sendo o meio de número 4 o melhor para produção de microescleródios. No presente trabalho, a produção de MS mL^{-1} foi menor que alguns resultados na literatura, contudo a produção de conídios por grama de microescleródios pode ser comparada a tais estudos. Como exemplo, o isolado ESALQ1638 produziu $3{,}56\times10^{3}$ MS mL^{-1} e após adição do inerte, terra de diatomácea, e secagem houve produção de $6{,}7\times10^{9}$ conídios por grama de MS após sete dias de reidratação dos microescleródios. Por outro lado, Jackson e Jaronski (2009) obtiveram produção máxima de $10{,}3\times10^{4}$ MS mL^{-1} ao quarto dia e uma produção de conídios de $3{,}53\times10^{9}$ por grama de microescleródios após 8 dias de incubação dos microescleródios.

O incremento de área foliar e peso seco de plantas de milho tratadas por microescleródios de *Metarhizium* indicam a existência de interações entre o fungo e a planta. A interação entre planta e fungo possibilita aumento no desenvolvimento vegetativo das plantas hospedeiras (BEHIE; JONES; BIDOCHKA, 2015; JABER; ENKERLI, 2016; CANASSA et al., 2019) e na produção (GARCÍA et al., 2011; GATHAGE et al., 2016). Similar aos resultados obtidos no presente trabalho, Kabaluk e Ericsson (2007) mostraram aumento no peso de plantas provenientes de sementes de milho inoculadas por conídios de *Metarhizium anisopliae*. Estudos mostraram a existência de translocação de nutrientes entre planta e fungos entomopatogênicos (BEHIE; ZELISKO; BIDOCHKA, 2012) e que o incremento de biomassa e o crescimento vegetativo de plantas inoculadas pelo fungo pode ser dependente da disponibilidade de nutrientes do solo cultivado (TALL; MEYLING, 2018). Além da questão nutricional, estudos mostram que alguns fungos entomopatogênicos são capazes de produzir e regular hormônios de crescimento em plantas tal como auxina (LIAO et al., 2017). As respostas de incremento no crescimento das plantas de milho foram diferentes entre os isolados de *Metarhizium*. Foi observado promoção na altura de planta pelo ESALQ1638 enquanto que a biomassa acumulada foi maior em plantas inoculadas por ESALQ1814 e ESALQ2450 após 30 dias de semeadura. Outros estudos também observaram variação no crescimento de plantas inoculadas por diferentes isolados do fungo do gênero *Metarhizium* (GARCÍA et al., 2011; LIAO et al., 2014).

A utilização de microescleródios como ferramenta de manejo de lagartas de *Spodoptera frugiperda* através do tratamento de semente de milho revelou ser um método com potencial. A mortalidade acumulada de lagartas alimentadas por folhas de plantas inoculadas atingiu valores até 35% superior ao controle não inoculado no sétimo dia e TL_{50} de 5 dias. O potencial de microescleródios de *Metarhizium* no controle de pragas no solo via produção de conídios no ambiente foi comprovado por trabalhos anteriores (JACKSON; JARONSKI, 2009; BEHLE; JACKSON; FLOR-WEILER, 2013; BEHLE; JACKSON, 2014; BEHLE et al., 2015; GARDESCU et al., 2017). Outros estudos mostram efeitos negativos na sobrevivência e no desenvolvimento de lagartas alimentadas por plantas colonizadas endofiticamente por fungos entomopatogênicos utilizando métodos de inoculação de conídios via semente (CHERRY et al., 2004; POWELL et al., 2007; CASTILLO LOPEZ; SWORD, 2015; RESQUÍN-ROMERO et al., 2016). A inovação do presente trabalho foi a utilização de microescleródios no controle de insetos de forma indireta via tratamento de sementes. Além disso, é o primeiro relato de aplicação de microescleródios com controle eficiente de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, importante praga na cultura do milho mundialmente.

As lagartas mortas nos bioensaios foram colocadas em câmara úmida e não apresentaram crescimento e esporulação de *Metarhizium* nos cadáveres. A ausência de micoses nos insetos mortos que foram alimentados por plantas inoculadas por entomopatógenos também foi relatada por outros autores (CHERRY et al., 2004; AKUTSE et al., 2013; CASTILLO LOPEZ; SWORD, 2015; MANTZOUKAS; CHONDROGIANNIS; GRAMMATIKOPOULOS, 2015). A ausência de colonização do fungo nas lagartas sugere que a mortalidade é resultado da interação do fungo com a planta. Acredita-se que o mecanismo de ação esteja associado à ativação de defesas da planta ou a produção de metabólitos secundários pelo fungo ou na combinação destes dois fatores. A planta em resposta ao ataque de organismos sofre estresse que pode levar a produção de compostos de rotas fisiológicas envolvidas na produção de enzimas que induzem a ativação de seu sistema de defesa contra o estresse. Estudos detectaram a biossíntese de metabólitos secundários em taxas acima do normal em plantas inoculadas previamente por fungos entomopatogênico. Por exemplo, Shrivastava et al. (2015) associaram a diminuição de peso de lagartas alimentadas por folhas de tomate colonizadas endofiticamente por *Beauveria* com a alta síntese de metabólitos secundários (terpenos). Outros componentes como os fitormônios, ácido salicílico e ácido jasmônico, exercem importante função em rotas relacionadas à indução do sistema de defesa de plantas em resposta a algum estresse causado pelo ataque de patógenos e danos causados pela alimentação de insetos (WAR et al., 2011; NAVARRO-MELÉNDEZ; HEIL, 2014).

Vários estudos revelaram a ação de toxinas secretadas pelos fungos entomopatogênicos, tais como destruxina, beauvericina e oosporeina, na inibição da alimentação e mortalidade dos insetos, (AMIRI; IBRAHIM; BUTT, 1999; CHERRY et al., 2004; GOLO et al., 2014; TAIBON et al., 2015; RESQUÍN-ROMERO et al., 2016; LEFORT et al., 2016; GARRIDO-JURADO et al., 2017). Embora toxinas, como a destruxina, tenham sido detectadas em plantas colonizadas pelos fungos, não é conhecido se a baixa concentração destas poderia ser responsável pelos efeitos nas pragas. Estudos mais detalhados sobre a indução do sistema de defesa bem como na produção de metabólitos secundários que apresentam efeito inseticida ainda são necessários.

Embora tenham sido observados efeitos de mortalidade de *S. frugiperda* e benéficos às plantas inoculadas pelo fungo, não foi comprovada a colonização endofítica de *Metarhizium* nos tecidos das plantas 30 dias após a inoculação das sementes de milho. É possível que a colonização tenha sido transitória e a persistência menor do que 30 dias. Contudo foi observada a persistência de conídios viáveis de *Metarhizium* no solo dessas plantas. Estudos indicam que a ação endofítica de entomopatogênicos e o reisolamento do fungo a partir de tecidos vegetais estão intimamente ligados a espécie de planta hospedeira e ao fungo inoculado, sendo a quantidade desse fungo decrescente ao longo do tempo (AKUTSE et al., 2013; RUSSO et al., 2015; PARSA et al., 2016). Similarmente, Mutune et al. (2016) não conseguiram detectar a colonização de *Metarhizium* em plantas de feijão inoculadas por conídios via tratamento de semente, contudo a presença do fungo nessas plantas proporcionou diminuição da população de *Ophiomyia phaseoli* que é uma espécie de Diptera praga de parte aérea. No presente trabalho, o uso de técnicas moleculares poderia revelar se o fungo estava em quantidades não detectáveis pelo método de cultivo em meio seletivo.

No presente trabalho não houve mortalidade significativa de *Dalbulus maidis* sobre plantas inoculadas por *Metarhizium* spp. (ESALQ1638, ESALQ1814, ESALQ2450) via semente de milho. A ineficiência no controle de *D. maidis* pode estar relacionada com o hábito alimentar sugador restrito ao floema da planta. Estudos apontam que o controle de insetos de hábito mastigador é mais eficiente que os de hábito sugador quando alimentados por plantas com fungo endofiticamente (JUNG et al., 2012; VEGA, 2018). González-mas et al. (2019) observaram que não houve efeito na sobrevivência de *Aphis gossypii* (Hemiptera; Aphididae) alimentados em plantas inoculadas por *Beauveria*. Entretanto, em dois estudos foram observados efeitos não letais das plantas inoculadas em pulgões. Foram observados efeitos negativos na reprodução e alimentação de *Aphis gossypii* sobre plantas inoculadas por diferentes gêneros de fungos entomopatogênicos (GURULINGAPPA et al., 2010). Jaber e Araj (2017) mostraram que o sugador *Myzus persicae* apresentou taxas de desenvolvimento e fecundidade alterados

negativamente após hospedarem plantas inoculadas endofiticamente por fungos entomopatogênicos. Aparentemente, esses efeitos em insetos sugadores, por fungos parece ser de forma indireta pela manifestação de efeitos sub-letais aos insetos, o que não foi objeto do presente estudo.

O efeito letal em *S. frugiperda* e o incremento no crescimento de plantas de milho indicam potencial de uso de microescleródios para o tratamento de sementes visando proteção às plantas. Os benefícios da aplicação de microescleródios de *Metarhizium* sugerem o uso do fungo de forma alternativa aos inseticidas químicos ou em associação ao controle convencional. Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam a necessidade de maiores estudos para viabilizar o uso desta estratégia de forma comercial e para entender os mecanismos envolvidos na relação entre planta, fungo e inseto. Estudos complementares também são necessários para determinar se existem efeitos sub-letais para *D. maidis* e outras pragas do milho quando alimentadas em plantas inoculadas por *Metarhizium*.

REFERÊNCIAS

AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 15 Jan. 2019.

AKUTSE, K. S. et al. 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 Ecology**, v. 6, p. 293-301, 2013.

AMIRI, B.; IBRAHIM, L.; BUTT, T. M. Antifeedant properties of destruxins and their potential use with the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for improved control of crucifer pests. **Biocontrol Science and Technology**, v. 9, n. 4, p. 487-498, 1999.

AMMAR, E. D. et al. Spiroplasma-like organisms closely associated with the gut in five leafhopper species (Hemiptera: Cicadellidae). **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 1, p. 35-44, 2011.

ARAÚJO, W.L. (Org.) et al. ii. Manual de isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CALQ, 2002.

ÁVILA, C. J., DEGRANDE, P. E., GOMEZ, S. A. Insetos pragas: reconhecimento, comportamento, danos e controle. In: Milho informações técnicas. EMBRAPA, 1997. 222p. (EMBRAPA/CPAO. Circular Técnica, 5).

BATISTA-PEREIRA, L. G. et al. Isolation , identification , synthesis , and field evaluation of the sex pheromone of the brazilian population of *Spodoptera frugiperda*. **J Chem Ecol**, v. 32, p. 1085-1099, 2006.

BAUDRON, F. et al. Understanding the factors influencing fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith) damage in African smallholder maizefields and quantifying itsimpact on yield. A case study in Eastern Zimbabwe. **Crop Protection**, v. 120, p. 141-150, 2019.

BEHIE, S. W.; JONES, S. J.; BIDOCHKA, M. J. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. **Fungal Ecology**, v. 13, p. 112-119, 2015.

BEHIE, S. W.; ZELISKO, P. M.; BIDOCHKA, M. J. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. **Science**, v. 336, n. 6088, p. 1576-1577, 2012.

BEHIE, S. W. et al. Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. **Nature Communications**, v. 8, p. 1-5, 2017.

BEHLE, R. W. et al. Evaluation of *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for control of japanese beetle larvae in turfgrass. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 4, p. 1587-1595, 2015.

BEHLE, R. W.; JACKSON, M. A. Effect of fermentation media on the production, efficacy, and storage stability of *Metarhizium brunneum* microsclerotia formulated as a prototype granule. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 2, p. 582-590, 2014.

BEHLE, R. W.; JACKSON, M. A.; FLOR-WEILER, L. B. Efficacy of a granular formulation containing *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales : Clavicipitaceae) microsclerotia against nymphs of *Ixodes scapularis* (Acari:Ixoididae). **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 1, p. 57-63, 2013.

BETTIOL, W. Biopesticioe use ano research in Brazil. **Outlooks on Pest Management**, v. 22, p. 280-283, 2011.

BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, n. 4, p. 512-530, 2009.

BORÉM, A.; GALVÃO, J.C.C.; PIMENTEL, M.A. **Milho: do plantio a colheita.** Viçosa:UFV, 2015. 351p.

BUGEME, D. M. et al. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* in controlling the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* on common bean in screenhouse and field experiments. **Insect Science**, v. 22, n. 1, p. 121-128, 2015.

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

CARLONI, E. et al. Presence of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) and of *Spiroplasma kunkelii* in the Temperate Region of Argentina. **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 4, p. 1574-1581, 2013.

CARROLL, G. C. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: Fokkema N. J., Van den Heuvel J. (Eds.) Microbiology of the phyllosphere. Cambridge, UK: Cambridge University Press. p. 205-222, 1986.

CARVALHO, R. A. et al. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, e62268, 2013.

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

CASTRO, T.; EILENBERG, J.; DELALIBERA, I. Exploring virulence of new and less studied species of *Metarhizium* spp. from Brazil for two-spotted spider mite control. **Experimental and Applied Acarology**, v. 74, n. 2, p. 139-146, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0222-6>.

CHERRY, A. J. et al. 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.

CHRISTENSEN, N. M. et al. Phytoplasmas and their interactions with hosts. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 11, p. 526-535, 2005.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v.6 Safra 2018/19 - Sexto levantamento, Brasília, p. 1-69, 2019. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>Acesso em: 29 mar. 2019.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v.12 Safra 2017/18 - Décimo segundo levantamento, Brasília, p. 1-148, 2018. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>Acesso em: 10 nov. 2018.

COSTA, V. H. D. et al. *Nomuraea rileyi* (Hypocreales : Clavicipitaceae) in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) larvae in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 98, n. 2, p. 796-798, 2015.

CRUZ, I. **A Lagarta-Do-Cartucho Na Cultura Do Milho.** EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 1995. 45 p. (EMBRAPA/CNPMS. Circular Técnica, 21).

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; SILVA, R. B. **Monitoramento de Adultos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) e *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera:Pyralidae) em Algumas Regiões Produtoras de Milho no Brasil.** EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 2010. 45 p. (EMBRAPA/CNPMS. Circular Técnica, 93).

FARGUES, J. et al. Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by near-ultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 69, n. 1, p. 70-78, 1997.

FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p. 150-158, 2014.

FRANCIS, C. A.; RUTGER, J. N.; PALMER, A. F. E. A rapid method for plant leaf area estimation in maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, v. 9, n. 5, p. 537, 1969.

FRONZA, E. et al. *Metarhizium* (*Nomuraea*) *rileyi* as biological control agent. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 11, p. 1243-1264, 2017.

GARCÍA, J. E. et al. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. **Advance in Biological Research**, v. 5, n. 1, p. 22-27, 2011.

GARDESCU, S. et al. *Metarhizium* microsclerotia and hydrogel versus hydromulch: testing fungal formulations against Asian longhorned beetles. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, v.8 , p. 1-13, 2017.

GARRIDO-JURADO, I. et al. 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, p. 319-330, 2017.

GATHAGE, J. W. et al. Prospects of fungal endophytes in the control of *Liriomyza leafminer* flies in common bean *Phaseolus vulgaris* under field conditions. **BioControl**, v. 61, n. 6, p. 741-753, 2016.

GOBLE, T. A. et al. Evaluating different carriers of *Metarhizium brunneum* F52 microsclerotia for control of adult Asian longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 26, n. 9, p. 1212-1229, 2016a.

GOBLE, T. A. et al. Conidial production, persistence and pathogenicity of hydromulch formulations of *Metarhizium brunneum* F52 microsclerotia under forest conditions. **Biological Control**, v. 95, p. 83-93, 2016b.

GOLO, S. et al. Production of destruxins from *Metarhizium* spp. fungi in artificial medium and in endophytically colonized cowpea plants. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

GONZÁLEZ-MAS, N. et al. Bottom - up effects of endophytic *Beauveria bassiana* on multitrophic interactions between the cotton aphid , *Aphis gossypii* , and its natural enemies in melon. **Journal of Pest Science**, p. 1-11, 2019.

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

GURULINGAPPA, P. et al. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. **Biological Control**, v. 55, n. 1, p. 34-41, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.06.011>.

HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ et al. Specific diversity of *Metarhizium* isolates infecting *Aeneolamia* spp. (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane plantations. **Neotropical Entomology**, v. 45, n. 1, p. 80-87, 2016.

HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, C.; GUZMÁN-FRANCO, A. W. Species diversity and population dynamics of entomopathogenic fungal species in the genus *Metarhizium* - a spatiotemporal study. **Microbial Ecology**, v. 74, n. 1, p. 194-206, 2017.

HOFFMANN, A. M. et al. Effects of entomopathogens on mortality of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) and fitness costs of resistance to Cry3Bb1 maize. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 1, p. 352-360, 2014.

HOGENHOUT, S. A. et al. Phytoplasmas: Bacteria that manipulate plants and insects. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 4, p. 403-423, 2008.

HUARTE-BONNET, C. et al. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* produces microsclerotia-like pellets mediated by oxidative stress and peroxisome biogenesis. **Environmental Microbiology Reports**, v. 00, p. 00-00, 2019.

HUMBER, R. A.; HANSEN, K. S.; WHEELER, M. M. Catalog of species. Ithaca, NY: ARSef ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, 55 p., 2011.

HUNTER, A. D. M. et al. The efficacy of *Metarhizium acridum* against nymphs of the italian locust , *Calliptamus italicus* (L .) (Orthoptera : Acrididae) in Uzbekistan and Georgia. **Bio One**, v. 25, n. 2, p. 61-65, 2016.

INGLIS, G. D.; GOETTEL, M. S.; JOHNSON, D. L. Persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on phylloplanes of crested wheatgrass and alfafa. **Biological Control**, v. 3, p. 258-270, 1993.

JABER, L. R.; ARAJ, S. E. 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**, 2017.

JABER, L. R.; ENKERLI, J. Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth? **Biocontrol Science and Technology**, v.27, n1, p. 28-41, 2016.

JACKSON, M. A.; DUNLAP, C. A.; JARONSKI, S. T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **BioControl**, v. 55, p. 129-145, 2010.

JACKSON, M. A.; JARONSKI, S. T. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. **Mycological Research**, v. 113, p. 842-850, 2009.

JACKSON, M. A.; JARONSKI, S. T. Development of pilot-scale fermentation and stabilisation processes for the production of microsclerotia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* strain F52. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, p. 915-930, 2012.

JACKSON, M.A.; JARONSKI, S.T. (2016) Composition of entomopathogenic fungus and method for production and application for insect control, U.S. Patent Application 2016/0000092, submetida Setembro 15, 2015.

JARONSKI, S. T. (2014) Mass production of entomopathogenic fungi: state of the art, p. 357-413. In: Morales-Ramos, J. A.; Rojas, Guadalupe M.; Shapiro-Ilan, D. (eds.), Mass production of beneficial organisms invertebrates and entomopathogens. Elsevier Inc., New York, NY.

JARONSKI, S. T.; MASCARIN, G. M. Mass production of entomopathogenic fungi : state of the art. In: LAWRENCE LACEY **Microbial Control of Insect and Mite Pests**. p. 141-155, 2017.

JARONSKI, S. T. Mass production of entomopathogenic fungi: state of the art. In: MORALES-RAMOS, J. A.; ROJAS, M. G.; SHAPIRO-ILAN, D. J. (Ed.), Mass Production of Beneficial Organisms. Elsevier Inc., Amsterdam, p. 357-415, 2013.

JARONSKI, S. T.; JACKSON, M. A. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 8, p. 849-863, 2008.

JUNG, S. C. et al. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, n. 6, p. 651-664, 2012.

KABALUK, J. T.; ERICSSON, J. D. *Metarhizium anisopliae* seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. **Agron. J.**, v. 99, p. 1377-1381, 2007.

KHAENJE, A.; GOHOLE, L. S.; MANIANIA, N. K. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* for termite (Isoptera : termitidae) management in maize under field conditions. **African Crop Science Conference Proceedings**, v. 11, p. 195-198, 2013.

LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1-41, 2015.

LEFORT, M.-C. et al. Natural occurrence of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* as a vertically transmitted endophyte of *Pinus radiata* and its effect on above- and below-ground insect pests. **New Zealand Plant Protection**, v. 69, p. 68-77, 2016.

LEITE, N. A. et al. Rapid selection and characterization of Cry 1F resistance in a Brazilian strain of fall armyworm. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 158, p. 236-247, 2016.

LENTH R.V. emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means [Computer software manual]. 2018. https://cran.r-project.org/package=emmeans (R package version 1.1.3).

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

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

LUZ, C.; ROCHA, L.F.N.; MONTALVA, C.; SOUZA, D.A.; BOTELHO, A.B.R.Z.; LOPES, R.B.; FARIA, M.; DELALIBERA, I. *Metarhizium humberi* sp. nov. (Hypocreales: Clavicipitaceae), a new member of the PARB clade in the *Metarhizium anisopliae* complex from Latin America. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 166, 2019.

MALLEBRERA, B. et al. In vitro mechanisms of Beauvericin toxicity: A review. Food and Chemical Toxicology, v. 111, p. 537-545, 2018.

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

MASCARIN, G. M. et al. Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp . using submerged liquid culture fermentation. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 30, p. 1583-1590, 2014.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. **Biological Control**, v. 43, n. 2, p. 145-155, 2007.

MORAL R., HINDE J., DEMÉTRIO C. Half-Normal plots and overdispersed models in R: The hnp package. **Journal of Statistical Software**, v. 81, p. 1-23, 2017.

MUTUNE, B. et al. Fungal endophytes as promising tools for the management of bean stem maggot *Ophiomyia phaseoli* on beans *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Pest Science**, v. 89, n. 4, p. 993-1001, 2016.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L. Behavior and distribution of the two fall armyworm host strains in Florida. **Florida Entomologist**, v. 87, n. 4, p. 440-449, 2004.

NAULT, L. R. Evolution of insect pest: maize and leafhopper, a case study. **Maydica**, v. 35, p. 165-175, 1990.

NAULT, L.R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogens host ranges, and vectors. **Phytopathology**, v. 70, n. 7, p. 659- 662, 1980.

NAVARRO-MELÉNDEZ, ARIANA L.; HEIL, MARTIN Symptomless endophytic fungi suppress endogenous levels of salicylic acid and interact with the jasmonate-dependent indirect defense traits of their host, Lima Bean (*Phaseolus lunatus*). **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, n. 7, p. 816-825, 2014.

OLIVEIRA, E. et al. "Enfezamento pálido" e "enfezamento vermelho" na cultura do milho no Brasil central. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 45-47, 1998.

OLIVEIRA, C. M. et al. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, v. 56, p. 50-54, 2014.

OLIVEIRA, C. M. de; LOPES, J. R. S.; SILVA, R. B. Q. da (2017) Técnicas de criação da cigarrinha-do-milho para estudos de transmissão e de controle biológico. In: Oliveira, C. M.; Sabato, E. O. (Eds). Doenças em milho: insetos-vetores, molicutes e viroses. Brasília, DF: Embrapa, 155-180.

OMOTO, C. et al. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest management science**, v. 72, n. 9, p. 1727-1736, 2016.

PARRA, J. Biological Control in Brazil: An overview. **Sci. Agric.** v. 71, p. 345-355, 2014

PARSA, S. et al. Fungal endophytes in germinated seeds of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. **Fungal Biology**, v. 120, n. 5, p. 783-790, 2016.

PAVA-RIPOLL, M. et al. The rhizosphere-competent entomopathogen *Metarhizium anisopliae* expresses a specific subset of genes in plant root exudates. **Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 47-55, 2011.

PEREIRA, P. R. V. da S.; SALVADORI, J. R. **Guia para identificação de corós rizófagos (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) comumente encontrados em cereais de inverno, milho e soja no norte do Rio Grande do Sul.** EMBRAPA Trigo, 2006. 12 p. (EMBRAPA Trigo. Comunicado Técnico Online, 204).

POWELL, W.A.; KLINGEMAN, W.E.; OWNLEY, B.H.; GWINN, K.D.; DEE, M.; FLANAGAN, P.C. Endophytic *Beauveria bassiana* in tomatoes yields mycosis in tomato fruitworm larvae. **Hort Science**, v. 42, 933p. , 2007.

R CORE TEAM R.C. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found Stat Comput, 2018.

RESQUÍN-ROMERO, G. et al. Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 136, p. 23-31, 2016.

REZENDE, J. M. et al. Phylogenetic diversity of Brazilian *Metarhizium* associated with sugarcane agriculture. **BioControl**, v. 60, n. 4, p. 495-505, 2015.

RÍOS-MORENO, A. et al. Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonisation of Solanum tuberosum. **Biocontrol Science and Technology**, v. 26, p. 1574-1585, 2016.

ROBERTS, D. W.; ST. LEGER, R. J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects. **Advances in Applied Microbiology**, v. 54, p. 1-70, 2004.

RUSSO, MARÍA L. et al. Endophytic colonisation of tobacco, corn, wheat and soybeans by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales). **Biocontrol Science and Technology**, v. 25, n.4 p.475-480, 2015.

SABATO, E. de O.; LANDAU, E. C.; OLIVEIRA, C. M. **Recomendações para o manejo de doenças do milho disseminadas por insetos-vetores.** EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 2014. 15 p. (EMBRAPA/CNPMS. Circular Técnica, 205)

SASAN, R. K.; BIDOCHKA, M. J. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 1, p. 101-107, 2012.

SCHULZ, B.; GUSKE, S.; DAMMANN, U.; BOYLE, C. Endophyte-host interactions. II. Defining symbiosis of the endophyte-host in- teraction. **Symbiosis**, v. 25, p. 213-227, 1998.

SEPULVEDA, M. et al. Molecular, morphological and pathogenic characterization of six strains of *Metarhizium* spp. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae). **Chilean journal of agricultural research**, v. 76, n. 1, p. 77-83, 2016.

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

SIDDAIAH, C. N. et al. Elicitation of resistance and associated defense responses in *Trichoderma hamatum* induced protection against pearl millet downy mildew pathogen. Scientific Reports, v. 7, p. 1-18, 2017.

SONG, Z. et al. Comparative transcriptome analysis of microsclerotia development in *Nomuraea rileyi*. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 411, 2013.

STORER, N. P. et al. Discovery and Characterization of Field Resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, p. 1031-1038, 2010.

TAIBON, J. et al. Quantitative assessment of destruxins from strawberry and maize in the lower parts per billion range: combination of a QuEChERS- based extraction protocol with a fast and selective UHPLC-QTOF-MS Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistrhy**, v. 63, p. 5707-5713, 2015.

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

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. S. Controle biológico da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* com Baculovirus. EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 2009. 14 p. (EMBRAPA/CNPMS. Circular Técnica, 114).

VEGA, F. E. et al. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v. 2, n. 4, p. 149-159, 2009.

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

WAR, A. RASHID et al. Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L). **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1787-1792, 2011.

WEBB, D. R. et al. Oligonucleotides as hybridization probes to localize phytoplasmas in host plants and insect vectors. **Phytopathology**, v. 89, n. 10, p. 894-901, 1999.

WRIGHT, M. S.; CORNELIUS, M. L. Mortality and repellent effects of microbial pathogens on *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). **BMC microbiology**, v. 12, p. 291, 2012.

WYREBEK, M. et al. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. **Microbiology**, v. 157, n. 10, p. 2904-2911, 2011.

YOU-PING, Y. I. N. et al. Microsclerotia Artificial Inductions of *Nomuraea rileyi* CQNr01. **Scientia Agricultura Sinica**, v. 45, n. 23, p. 4801-4807, 2012.

YOUSEF, M. et al. Reduction of adult olive fruit fly populations by targeting preimaginals in the soil with the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum*. **Journal of Pest Science**, v. 90, n. 1, p. 345-354, 2017.

YPSILOS, I. K.; MAGAN, N. Characterisation of optimum cultural environmental conditions for the production of high numbers of *Metarhizium anisopliae* blastospores with enhanced ecological fitness. **Biocontrol Science and Technology**, v. 15, n. 7, p. 683-699, 2005.

ZHOU, G. et al. Involvement of an alternative oxidase in the regulation of hyphal growth and microsclerotial formation in *Nomuraea rileyi* CQNr01. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 1343-1352, 2015.