

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Influência da redução da microbiota epifítica na colonização
endofítica e persistência de *Beauveria bassiana* em soja, milho e
algodão**

Sara Giro Moreno

Dissertação para obtenção do título de mestre em
Ciências. Área de Concentração: Entomologia

**Piracicaba
2022**

Sara Giro Moreno
Bacharela em Ciências Biológicas

**Influência da redução da microbiota epifítica na colonização endofítica e
persistência de *Beauveria bassiana* em soja, milho e algodão**

Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ITALO DELALIBERA JUNIOR**

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

Piracicaba
2022

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

Moreno, Sara Giro

Influência da redução da microbiota epifítica na colonização endofítica e persistência de *Beauveria bassiana* em soja, milho e algodão / Sara Giro Moreno. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.

53 p.

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

1. Fungo entomopatogênicos 2. Endofítico 3. Microbiota 4. Controle biológico I. Título

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Italo Delalibera Júnior, pela orientação na execução desse projeto e pela confiança em meu trabalho ao longo dos quatro anos em que trabalhamos juntos.

Agradeço à Dra. Camila Costa Moreira por todo suporte durante planejamento, execução e análises. Sua companhia foi essencial durante essa jornada. Obrigada!

Agradeço ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote pela disponibilidade em colaborar e pelo conhecimento compartilhado.

À equipe do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano, especialmente à Bárbara Castelano e à Taisa Pavani por tornarem os dias, os experimentos, as disciplinas e a vida mais leves.

Obrigada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) pela estrutura e suporte. E por ser meu lar há 7 anos.

Ao departamento de Entomologia e Acarologia por proporcionar um ambiente tão múltiplo em conhecimento, onde tantas pessoas me ajudaram de diferentes formas.

Também agradeço o incentivo e carinho que minha família me ofereceu desde sempre. Olivia, Marcos, Artur, Aparecida: vocês me trouxeram até aqui! E ao Renan Baraldi, meu namorado, pelo apoio técnico e emocional. Não foi fácil!

Finalmente, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos fornecida.

EPÍGRAFE

Só vive o propósito quem suporta o processo.

(autor desconhecido)

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
1. Introdução.....	9
2. Revisão Bibliográfica	11
2.1. Controle Biológico no Brasil	11
2.2. Utilização de fungos entomopatogênicos	12
2.3. Utilização de <i>Beauveria bassiana</i> no controle biológico	13
2.4. Endofitismo	14
2.5. Importância da microbiota foliar	15
2.6. Utilização de luz ultravioleta-C para redução de microrganismos	16
2.7. Cultura de soja, algodão e milho	17
3. Material e Métodos	19
3.1. Material Biológico.....	19
3.1.1. Isolado fúngico.....	19
3.1.2. Produção de conídios via fermentação sólida	19
3.1.3. Produção de blastosporos via fermentação líquida	20
3.1.4. Cultivo de soja, milho e algodão e aplicação do fungo	20
3.2. Escolha de método para redução da microbiota do filoplano	21
3.2.1. Exposição ao gás ozônio	21
3.2.2. Exposição à luz ultravioleta-C.....	22
3.3. Análise da colonização e persistência de conídios.....	22
3.3.1. Pré-tratamento com luz UV-C	23
3.3.2. Persistência no filoplano	23
3.3.3. Colonização e persistência endofítica.....	24
3.4. Análise da colonização e persistência de blastosporos.....	24
3.5. Análise da promoção de crescimento das plantas	25
3.6. Análise estatística	25
4. Resultados.....	27
4.1. Escolha de método para redução da microbiota do filoplano	27
4.1.1. Exposição ao gás Ozônio	27
4.1.2. Exposição à luz ultravioleta-C.....	28
4.2. Análise da colonização e persistência de conídios.....	29
4.2.1. Persistência no filoplano	29
4.2.2. Colonização e persistência endofítica.....	33
4.3. Análise da colonização e persistência de blastosporos.....	36

4.4. Análise da promoção de crescimento da planta	38
5. Discussão	39
6. Conclusão.....	45
Referencias.....	47

RESUMO

Influência da microbiota foliar colonização endofítica e persistência de *Beauveria bassiana* em soja, milho e algodão

Fungos entomopatogênicos são agentes de controle biológico amplamente utilizados no Brasil e no mundo. A espécie *Beauveria bassiana* é utilizada como bioinseticida contra pragas em diversas culturas além de apresentar estilo de vida endofítico. Entender a dinâmica temporal do fungo em diferentes culturas de importância agrícola é importante para explorar os efeitos benéficos adicionais desse microrganismo. Além disso, é preciso considerar o papel que a microbiota residente nas folhas desempenha no processo de colonização. A persistência e a colonização endofítica foram avaliadas comparando plantas que tiveram ou não sua microbiota reduzida com utilização de luz ultravioleta-C antes da aplicação do fungo entomopatogênico. A quantidade de *B. bassiana* encontrada no filoplano um dia após a aplicação foi menor em plantas de soja e milho que tiveram a microbiota reduzida. A concentração do fungo no filoplano apresentou uma queda brusca entre 1 e 7 dias, enquanto internamente a redução se deu de forma mais lenta. Em ambos os casos, *B. bassiana* foi detectada durante os 28 dias do período experimental. Os blastosporos mostraram capacidade significativamente superior de colonização e persistência endofítica em soja em comparação aos conídios até 14 dias de avaliação. Por fim, verificou-se que a presença do fungo na planta influenciou positivamente no crescimento, apresentando maiores valores de biomassa nos tratamentos em que houve aplicação dos propágulos fúngicos. Estes resultados sobre a dinâmica temporal e estilo de vida multifuncional, de *B. bassiana* ampliam o conhecimento necessário para aplicações do fungo visando sua colonização endofítica para promoção de crescimento e indução de defesa sistêmica de plantas.

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos; Endofítico; Microbiota; Controle biológico

ABSTRACT

Microbiota influences on persistence and endophytic colonization of *Beauveria bassiana* in soybean, corn and cotton plants

Entomopathogenic fungi are biological control agents widely used in Brazil and worldwide. *Beauveria bassiana* is used as a bioinsecticide against pests in several crops and can endophytically colonize plants. Determining characteristics of the fungus temporal dynamics in different important crops is interesting to explore the additional benefits of this microorganism. In addition, it is necessary to consider the role of the resident microbiota in the leaves during the colonization process. Persistence and endophytic colonization were evaluated by comparing plants that had or did not have their microbiota reduced using ultraviolet-C light before application of the entomopathogenic fungus. The density of *B. bassiana* found in the phylloplane one day after the application was lower in soybean and corn plants with reduced microbiota. Persistence in the phylloplane showed a sharp drop between 1 and 7 days, while endophytic colonization decreased more slowly. In both cases, *B. bassiana* was found throughout the experimental period, 28 days after application. Blastospores showed a superior capacity for colonization and endophytic persistence in soybean, significantly higher than conidia up to 14 days of evaluation. The fungus colonization influenced plant growth, and the highest values of dry biomass were found in treatments in which a fungal propagule was applied. These results about the temporal dynamics and multifunctional lifestyle of *B. bassiana* expand the knowledge to use entomopathogenic fungi aiming at its endophytic colonization for plant growth promotion and systemic defense induction.

Keywords: Entomopathogenic fungi; Endophytic; Microbiota; Biological control

1. Introdução

O Brasil é uma grande potência agrícola e enfrenta constantemente diversos desafios para manter essa posição e avançar ainda mais. Dentre esses desafios estão o intenso ataque de pragas e exigências por práticas menos nocivas de controle das mesmas. O controle biológico de pragas surge como uma importante ferramenta capaz de impulsionar a prática agrícola para um modelo mais sustentável e eficiente. Dentre os organismos já explorados no controle biológico, os fungos entomopatogênicos estão entre os microrganismos mais utilizados como produtos comerciais em diversas culturas (Michereff Filho et al. 2009). A espécie *Beauveria bassiana* é utilizada contra importantes pragas agrícolas como a mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) principalmente em cultivos de soja e café (Mascarin e Jaronski 2016). Além da ação entomopatogênica, esses fungos também apresentam associação mutualística com as plantas sendo possível explorar os efeitos dessa associação na promoção de crescimento e indução de defesa sistêmica por meio da colonização endofítica (Vidal e Jaber 2015). Embora a associação de fungos entomopatogênicos e plantas já seja largamente observada em diversas espécies vegetais, após inoculação ou ocorrendo naturalmente (Quesada-Moraga et al., 2006; Russo et al., 2018; Ahmad et al., 2020), pouco se sabe sobre como ocorre essa associação após a aplicação de um bioinseticida e tempo de duração dessa interação.

Diversos estudos na área de controle biológico são focados nos agentes de controle biológico e em suas interações com os demais organismos do sistema: insetos, fitopatógenos e plantas. Quando um microrganismo é aplicado como controlador de pragas ou doenças, ele também interage com a microbiota da planta (Massart et al. 2015). Sabe-se que a superfície foliar abriga uma grande diversidade de microrganismos e que a diversidade, abundância desses é bastante variável entre as espécies de plantas (Lambais et al. 2006; Delmotte et al., 2009). A microbiota estabelece uma estreita relação com sua planta hospedeira e em muitos casos é essencial para o seu desenvolvimento (Müller et al., 2016). Entender essa relação torna possível explorar adaptações no manejo agrícola a respeito do momento adequado para aplicação do bioproduto e adoção de métodos que favoreçam a seleção de organismos benéficos naturalmente presentes na planta.

A fim de explorar o papel que a microbiota presente na superfície das folhas desempenha no momento da aplicação do entomopatógeno, buscou-se maneiras para reduzir a abundância e/ou diversidade desses microrganismos. A luz ultravioleta-C (UV-C) de ondas curtas vem sendo estudada devido a sua ação deletéria sobre microrganismos fitopatogênicos para o uso industrial em frutas e vegetais, podendo promover uma maior durabilidade desses alimentos (Quintero-Cerón et al., 2013). Analogamente, a exposição da parte aérea das plantas a essa radiação poderia promover uma redução de bactérias e fungos da superfície. Outra hipótese criada foi em relação ao gás ozônio, que é amplamente utilizado em processos de descontaminação de materiais hospitalares (GARCIA et al., 2009) e na indústria alimentícia (CARDOSO et al., 2003).

O presente estudo utilizou um isolado comercial de *B. bassiana* (ESALQ PL63), que é amplamente utilizado no Brasil, e teve como objetivo confirmar a capacidade de colonização endofítica após aplicação foliar em soja, milho e algodão, culturas de grande importância agrícola em que o uso de produtos à base desse fungo entomopatogênico já ocorre. Outro objetivo do estudo foi determinar o tempo de persistência do fungo nas superfícies das folhas e em seus tecidos internos. Para isso padronizou-se uma metodologia de reisolamento do fungo e avaliou-se o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama de folha. Para explorar a ação da microbiota no momento da colonização e na persistência do fungo, foi selecionado um método para redução da microbiota da superfície foliar, de modo que foi possível comparar esses fatores em plantas com microbiota reduzida e em estado natural e unir essas informações a dados de crescimento da planta.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Controle Biológico no Brasil

A proporção e a velocidade do crescimento do agronegócio brasileiro, sobretudo nos últimos 40 anos, são notórias. O ramo agrícola pode ser apontado como destaque na expansão do setor, sendo responsável por 70% dos rendimentos gerados pela categoria no ano de 2020 (Cepea, 2022). Contando com as vantagens e os desafios de atingir uma alta produtividade em um país de clima predominantemente tropical e extensas áreas cultiváveis, o Brasil tem grande relevância entre as potências mundiais, sendo considerado o terceiro maior produtor do mundo, com destaque para os cultivos de cana-de-açúcar, café, soja e milho (Miranda, 2020). Um desafio constantemente enfrentado por produtores das grandes culturas é o intenso ataque de pragas, cujo controle é feito, sobretudo, pelo uso de defensivos químicos de amplo espectro. Tal prática tem sido associada com desenvolvimento de resistência, redução de inimigos naturais e de polinizadores, contribuindo para ressurgência e surtos populacionais de pragas secundárias (Moscardi et al., 2012). Para minimizar esses prejuízos e atender à demanda crescente por tecnologias sustentáveis e eficazes, o controle biológico é uma alternativa indispensável.

São considerados como prática de controle biológico tanto a utilização de substâncias químicas naturais, como o de agentes biológicos de controle. Esses agentes podem ser macro-organismos, tais como predadores e parasitoides de insetos praga, ou microrganismos, - como vírus, bactérias e fungos capazes de infectar o inseto alvo em questão. Acompanhando o progresso do setor agrícola, o mercado de produtos biológicos vem crescendo de forma acelerada. Somente no ano de 2020 foram aprovados 96 novos produtos biológicos no país, e um crescimento do mercado de 30%, equivalente ao dobro do crescimento mundial nesse ano (14,4%) (CropLife, 2021). Além disso, a evolução do setor também pode ser observada pelo desenvolvimento de novas formulações e tecnologias de aplicação. A espelho do setor de hortifruti, em que 50% das áreas de cultivo de banana e mamão no Brasil já utilizam biodefensivos, espera-se que nas grandes culturas como soja, milho, algodão, cana-de-açúcar e café seja adotada essa

prática, impulsionando ainda mais o crescimento do mercado de biológicos nos próximos anos (CropLife, 2021).

Dos mais de 400 produtos registrados atualmente, cerca de 60% são compostos por agentes microbiológicos (CropLife, 2021). Essa predominância se deve à abundante diversidade de espécies de vírus, bactérias e fungos com potencial de uso, à facilidade de produção em larga escala e à similaridade dos métodos de aplicação com os produtos químicos que gera maior aceitação por parte dos produtores (Halfeld-Vieira et al., 2016).

2.2. Utilização de fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos são os agentes biológicos mais utilizado na composição de produtos no Brasil (Agrofit, 2022). São utilizados no país para controle de pragas desde a década de 1970 e atualmente representam um uso consolidado, traduzido por dezenas de micoinseticidas presentes no mercado (Agrofit, 2022). Além disso, esses fungos são alvo frequente de pesquisas e investimentos, destacando-se como uma tecnologia sustentável e eficiente (Pal e Gardener 2006; Michereff Filho et al. 2009)

Embora a pesquisa seja uma área continuamente alimentada com novas descobertas, pode-se dizer que atualmente existe um conhecimento sólido sobre a efetividade da utilização de diversas espécies de fungos entomopatogênicos no controle de pragas. Em vista disso, vive-se um momento do uso de fungos no controle biológico em que o foco é potencializar o uso dos agentes controladores. Isso pode ser feito de diversas maneiras como, por exemplo, o desenvolvimento de formulações que melhorem o desempenho do microrganismo em campo e aumente o tempo de prateleira dos produtos; desenvolvimento e novas tecnologias de aplicação e aproveitamento da multifuncionalidade dos agentes de controle (Mascarin et al., 2019).

Ainda, outra abordagem possível é em relação ao propágulo utilizado como princípio ativo, visto que a maioria dos fungos entomopatogênicos da ordem Hypocreales apresentam um ciclo dimórfico a ser explorado (Alves, 1986). A maioria dos produtos comerciais são formulados a partir de conídios aéreos capazes de

aderir e penetrar a cutícula do inseto. Por outro lado, muitos estudos já demonstraram a eficiência de outra estrutura, chamada de blastosporo, que é um tipo de célula leveduriforme que pode ser altamente infectiva para diversas espécies de insetos e ácaros (Cliquet and Jackson 1997; Mascarin et al. 2015; Iwanicki et al. 2018). Outra vantagem desse propágulo é em relação ao método de produção. Os blastosporos são produzidos por meio de fermentação líquida, modelo que permite a produção de grandes quantidades de propágulos em um curto intervalo de tempo (3 a 4 dias) e em menor espaço em comparação aos conídios, os quais são obtidos via fermentação sólida, que tem como substrato para crescimento do fungo um cereal, geralmente arroz, e requer espaço físico maior para aguardar durante cerca de 10 dias até que os propágulos sejam produzidos (Mascarin et al., 2015).

2.3. Utilização de *Beauveria bassiana* no controle biológico

Espécies dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Cordyceps* (= *Isaria*) pertencem à ordem Hypocreales, e são os mais comumente utilizados no controle biológico visto que muitas espécies possuem ampla gama de insetos hospedeiros e são passíveis de produção massal (Butt et al., 2016).

A espécie *Beauveria bassiana*, pertence à divisão Ascomycota, Classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales, família Cordycipitaceae tem distribuição cosmopolita e é encontrado naturalmente no solo (Rehner et al., 2011). Essa espécie é capaz de infectar e provocar a morte, a uma ampla variedade de insetos e ácaros (Mascarin e Jaronski, 2016). Para o controle de pragas, *B. bassiana* é amplamente utilizada na forma de conídios aéreos, que são aplicados em grandes quantidades diretamente nos insetos-alvo, em seu habitat.

Grandes programas de controle biológico já foram aplicados e consolidados no Brasil, como é o caso da utilização de *B. bassiana* contra *Bemisia tabaci* em soja e contra *Hypothenemus hampei* na cultura do café (Mascarin et al. 2019). Produtos a base desse *B. bassiana* também são posicionados para o controle de *Sphenophorus levis*, *Gonipterus scutellatus* e *Tetranychus urticae* nas culturas em que ocorrem (Koppert, 2022).

2.4. Endofitismo

A versatilidade dos fungos Hypocreales é uma característica que certamente contribuiu para seu sucesso evolutivo. Esses microrganismos podem ser encontrados no solo, no corpo de insetos ou ainda nos tecidos internos de plantas. O último hábito citado é conhecido como endofitismo e pode ser definido como a capacidade de viver no interior de plantas sem lhe causar sintomas aparentes (Schulz e Boyle, 2005). Esse tipo de associação entre planta e algumas espécies de fungos entomopatogênicos é classificada como mutualismo, visto que benefícios para ambos os organismos podem ser observados (Vidal e Jaber, 2015). Por um lado, o fungo se beneficia de um habitat protegido de estresse abióticos a que seria exposto estando na superfície; por outro, a planta se beneficia com a presença desses microrganismos que podem ser bioestimulantes ou ainda agirem na defesa contra insetos praga e patógenos (Garrido-jurado et al., 2016; Lopez & Sword, 2015).

A supressão de pragas e doenças das plantas pode ocorrer por diferentes mecanismos como competição por nutrientes ou espaço, antibiose, interação direta, como a patogenicidade e parasitismo, e indução de resistência do hospedeiro (Pieterse et al. 2014). Um estudo mostra que em plantas de algodão houve uma redução expressiva na reprodução de pulgões e prejuízos ao desenvolvimento de *Helicoverpa zea* em razão da colonização endofítica por *B. bassiana* (Gurulingappa et al. 2010; Lopez e Sword 2015). Outro efeito interessante é a promoção de crescimento e ativação de mecanismos de resistência a estresse, como observado por Khan e colaboradores (2012) em plantas de soja a partir da colonização pelo fungo *Metarhizium anisopliae*.

Já ostensivamente utilizada como bioinseticida, *B. bassiana* tem um grande potencial a ser explorado como organismo endofítico. Em 2000, Wagner e Lewis encontraram pela primeira vez *B. bassiana* nos tecidos internos de milho e verificaram que sua presença causava mortalidade em larvas de *Ostrinia nubilalis* que se alimentavam da planta. Naturalmente ou a partir de inoculação artificial, a espécie já foi constatada como endofítica em diversas plantas como soja (Khan et al.

2012), cacau (Posada e Vega 2006), tomate (Jaber e Ownley 2018), algodão (Gurulingappa et al. 2010), entre outras.

Ainda outro aspecto importante em relação a presença de *B. bassiana* em tecidos vegetais é a sua capacidade de produzir metabólitos secundários, principalmente quitinases, lipases e proteases e amilase, asparaginase, celulase e galactosidase (Amobonye et al. 2020) que podem ser explorados em relação a uma possível ação antimicrobiana ou até mesmo efeitos letais e/ou subletais em insetos expostos a plantas colonizadas (Vidal e Jaber 2015).

2.5. Importância da microbiota foliar

Os tecidos vegetais são habitados por comunidades de microrganismos, com as quais a planta interage em altos níveis de complexidade e interdependência. É estimado que existam de 10^6 a 10^7 células não próprias por centímetro quadrado de tecido em folhas (Lindow e Brandl, 2003) e de 10^6 a 10^9 por grama de tecido em raízes (Whitman et al. 1998). O desenvolvimento dessa relação, levou a criação da teoria chamada de holobionte, que exigiu um alto grau de adaptabilidade das plantas ao longo da história evolutiva, de modo que hoje é possível enxergar a planta e sua microbiota como uma unidade evolutiva com relações genéticas e metabólicas integradas com objetivo em comum de se adaptar ao ambiente (Berg et al., 2020). Nessa linha de raciocínio, Müller e colaboradores (2016) sugerem que o fenótipo da planta é resultado das inúmeras relações que ela estabelece com sua microbiota em um ambiente e tempo determinados.

Os estudos nessa área são crescentes e a maior parte dos esforços é direcionada à rizosfera, sendo a filosfera um ambiente menos explorado. A parte aérea das plantas, composta principalmente por caule e folhas, se encontra sob a ação de fatores bióticos e abióticos que podem torná-la um ambiente hostil ao estabelecimento de microrganismos (Lindow e Brandl, 2003). Em especial, pode-se destacar as características morfológicas e bioquímicas próprias do hospedeiro, a presença de fitopatógenos e as condições ambientais como radiação, vento e umidade que atingem diretamente esses tecidos. Ainda assim, a superfície das folhas está entre os habitats mais abundantes em microrganismos do planeta

(Lindow e Brandl 2003). Os microrganismos mais abundantes são as bactérias, os fungos filamentosos e leveduriformes e é constatado que eles são capazes de influenciar a aptidão da planta por meio de indução do sistema de defesa, promovendo o crescimento, melhorando o aproveitamento de nutrientes ou conferindo maior resistência a estresses bióticos e abióticos (Stone et al. 2018).

A composição da microbiota da filosfera é dependente da espécie de planta e seu genótipo e pode variar de acordo com a composição química da cutícula e a morfologia desse órgão (Vorholt 2012). Além disso, a microbiota que vive na superfície das folhas está mais diretamente exposta à temperatura, radiação UV, umidade relativa e impacto das chuvas (Hirano e Upper 2000; Lindow e Brandl 2003; Whipps et al. 2008). Estudos sugerem que exista uma forte especificidade entre as espécies que vivem no habitat foliar com suas espécies hospedeiras, visto que diferem daquelas que são comumente encontradas no solo (Lauber et al. 2009) ou em amostras de ar (Bowers et al. 2009). Essas observações contestam a ideia de que as bactérias e fungos da filosfera são simplesmente habitantes passivos, depositados ao acaso nas folhas. Os resultados obtidos por Redford e colaboradores (2010) demonstraram que, das 56 espécies arbóreas analisadas, aquelas mais próximas filogeneticamente abrigam comunidades bacterianas mais semelhantes. O mesmo estudo ainda demonstrou que em *Pinus ponderosa*, as comunidades bacterianas presente nas folhas são comuns entre espécimes distantes geograficamente, reforçando a ideia de uma coevolução.

Sendo reconhecidas a importância da microbiota para a planta e a eficácia dos agentes de controle microbiano, é interessante explorar os possíveis efeitos que o estabelecimento do contato entre eles é capaz de causar. É bastante interessante entender como essas espécies naturalmente presentes naquele ambiente atuam em benefício ou obstáculo para o sucesso da colonização e estabelecimento dos agentes de controle na planta.

2.6. Utilização de luz ultravioleta-C para redução de microrganismos

A luz ultravioleta de ondas curtas (de 100 nm até 280 nm), chamada de UV-C, possui ação germicida já bastante conhecida e explorada. Sua ação se dá pela

capacidade de alterar o material genético de microrganismos, resultando em sua eliminação (Bioseta, 2021).

Em ambiente hospitalares, a luz UV-C é utilizada para esterilizar superfícies e ambientes (Lindblad et al., 2020). Em práticas agrícolas, esse método tem sido adotado para controle de doenças pós-colheita (Stevens et al., 1997). Ainda, a indústria alimentícia pode usar essa ferramenta como forma de aumentar a segurança e estabilidade de alimentos (Gayán et al., 2014).

2.7. Cultura de soja, algodão e milho

Soja, algodão e milho são três culturas de grande importância no Brasil e no mundo. Juntas, essas culturas ocupam mais de 85% das áreas destinadas ao plantio de grãos no país (Cepea, 2022). Tamanha relevância se deve à versatilidade desses produtos e subprodutos. Soja e milho fazem parte da alimentação humana e de animais e servem como matéria-prima para produção de biodiesel e etanol, biocombustíveis cada vez mais utilizados como alternativas aos combustíveis fósseis (Gran-milho, 2022). O algodão, utilizado na indústria têxtil também é destaque no agronegócio nacional, rendendo ao país a posição de quarto maior produtor e segundo maior exportador mundial da fibra (Abrapa, 2022).

Os produtores dessas culturas enfrentam diversos desafios para manter a alta produtividade que nos garante destaque no cenário agrícola mundial. Certamente o ataque de pragas e doenças é um desafio constante. A ocorrência de lagartas, percevejos, afídeos, entre outros insetos, bem como microrganismos fitopatogênicos podem causar grandes prejuízos à produção (Embrapa, 2022). Dentre outras ferramentas do manejo integrado de pragas, o uso de produtos a base de fungos entomopatogênicos é amplamente utilizado nas lavouras por todo o país (Michereff, 2009). Um bom exemplo a ser citado é o uso de *B. bassiana* no controle de Mosca-branca (*B. tabaci*). Essa praga é de larga ocorrência nas culturas de soja e algodão e é especialmente importante por ser transmissora de viroses às plantas (Agrolink, 2022). Benefícios da ação endofítica de fungos entomopatogênicos nessas culturas também já foram relatados, como a supressão de *O. nubilalis* em plantas de milho após inoculação e estabelecimento de *B. bassiana* (Bing & Lewis, 1992), a

promoção de crescimento em plantas de algodão inoculadas como *B. bassiana* e *Purpureocillium lilacinum* (Lopez e Sword, 2015) e as alterações em parâmetros biológicos e reprodutivos provocadas em *Helicoverpa gelotopoeon* pela presença endofítica de *B. bassiana* que levaram ao menor consumo de folhas em plantas de soja (Russo et al., 2018).

3. Material e Métodos

3.1. Material Biológico

3.1.1. Isolado fúngico

O isolado de *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 foi obtido a partir da Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” localizada no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), Piracicaba, Brasil. O fungo foi cultivado em meio Batata Dextrose Ágar – BDA Difco™ (39,0 g mL⁻¹), sendo incubado em câmara climatizada a 26 °C e 12 horas de fotofase durante 10 dias. A partir deste inóculo, uma suspensão foi preparada e, na sequência, realizadas diluições seriadas a fim de se obter uma diluição com no máximo 1x10³ conídios/mL. Uma alíquota de 100 µl dessa suspensão foi espalhada em uma placa de Petri contendo meio BDA com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas em B.O.D a 26 °C e 12 horas de fotofase durante 3 dias ou até que se observou a formação inicial das colônias. Uma única colônia foi retirada do meio de cultura com o auxílio de uma alça de platina e espalhada em uma nova placa de Petri com meio BDA, dando origem a uma cultura monospórica que foi utilizada nos experimentos e preservada. Pequenos pedaços de meio contendo o fungo foram preservados em tubos criogênicos estéreis com solução de glicerol a 10% e mantidos em freezer a -80°C. A partir disso, todos os experimentos foram realizados utilizando-se o material preservado dessa forma.

3.1.2. Produção de conídios via fermentação sólida

Placas de Petri contendo o isolado fúngico esporulado foram raspadas para obtenção de conídios. Os conídios foram suspensos em solução 0,05% do adjuvante monoleato de polioxietilenosorbitano (Tween®80). Essa suspensão original foi diluída em série para contagem em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para 5x10⁷ conídios/ mL. Cinco mililitros dessa suspensão foram utilizados para a inoculação de frascos do tipo Schott de 250 mL contendo 350 g de arroz (peso seco) parboilizado tipo 1 previamente hidratado e esterilizados em autoclave a

120° C por 20 minutos. Os frascos foram agitados para obter-se uma distribuição uniforme do inóculo e incubados em câmara climatizada do tipo B.O.D. a 26°C e 12h de fotofase por 10 dias. Após esse período, a extração dos conídios foi realizada com a adição de 250 mL de água destilada com 0,05% de monoleato de polioxietilenosorbitano (Tween®80), agitação manual em cada frasco e filtragem em dupla camada de gaze.

3.1.3. Produção de blastosporos via fermentação líquida

Placas de Petri contendo o isolado fúngico esporulado foram raspadas para obtenção de conídios, que foram adicionados em solução do adjuvante monoleato de polioxietilenosorbitano (Tween®80) a 0,05%. Essa suspensão original foi diluída em série para contagem em câmara de Neubauer e ajuste da concentração para 5×10^6 conídios/ mL e 5 mL foram inoculados em 45 mL de meio de cultura líquido em frascos Erlenmeyers de 250 mL. Foi utilizado o meio Adamek modificado contendo 8% de fonte de proteína (milhocina da marca Ingredion), vitaminas (tiamina, riboflavina, pantotenato, niacina, piridoxina, ácido fólico, biotina e vitamina B12), sais minerais (KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e FeSO_4), metais ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 14% de glucose e pH final ajustado para 6.8 conforme descrito em Iwanicki et al. (2018). Os fracos foram mantidos em mesa agitadora com 10 mm de diâmetro de órbita (Solab®, Piracicaba, SP, Brasil) a 350 rpm e a 28°C por três dias para produção dos blastosporos.

3.1.4. Cultivo de soja, milho e algodão e aplicação do fungo

Sementes de soja (variedade BRS-284), milho (híbrido, Fórmula, Syngenta, Brasil) e algodão (variedade BS 2106 GL) foram plantadas em vasos de 3 L contendo substrato para plantas e fertilizante de liberação lenta com nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) na proporção 4-12-8. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação no Departamento de Entomologia e Acarologia sem controle de temperatura e irrigados diariamente de forma manual.

A suspensão de conídios ou blastosporos foi pulverizada em toda a superfície das plantas, em estádio V3, utilizando um aerógrafo. Para cada planta foram utilizados 2 ml da suspensão de conídios ou blastosporos na concentração de 1×10^8 propágulos/ mL.

3.2. Escolha de método para redução da microbiota do filoplano

Para avaliar a influência da microbiota das plantas na colonização endofítica por *B. bassiana*, dois métodos de redução da microbiota foram testados.

3.2.1. Exposição ao gás ozônio

Para avaliar a eficiência do gás ozônio na redução da microbiota do filoplano, plantas de soja foram submetidas a exposição a esse gás utilizando um sistema de geração e transferência de ozônio da (BRO3 PLUS 2, Brasil ozônio, Brasil) na vazão 4 (40g/Nm^3). Foram testadas duas metodologias e diferentes tempos de exposição. No experimento I, realizado em condição fechada, os vasos de plantas foram posicionados dentro de sacos plásticos fechados com mangueiras acopladas para entrada e saída do gás e com tempos exposição 5, 10 e 15 minutos. No experimento II, o gás ozônio foi aplicado em condição fechada, como descrito acima, e aberta, com direcionamento da mangueira de saída gás diretamente sobre a planta. Nesse experimento foram avaliados os tempos de exposição de 1 e 2 minutos. Ambos os experimentos foram realizados utilizando-se plantas de soja em estádio V3.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação para avaliação de danos causados pela exposição ao gás ozônio. Em ambos os experimentos, 4 folíolos de cada planta foram coletados após a exposição ao gás. De cada folíolo foi cortado um disco em tamanho padrão (12cm^2) com auxílio de um vazador. A superfície adaxial e abaxial de cada disco de folha foi prensada individualmente sobre placas de Petri contendo meio de cultura BDAY (batata, dextrose, ágar – Difco 39g/L- e extrato de levedura 1g/L) + pentabiótico (0,05g/L) para avaliar o crescimento de colônias de fungos e Agar nutritivo – HiMedia (28g/L) + ciclohexamida (0,05g/L) para avaliar o crescimento de colônias de bactérias. Foram utilizadas duas plantas por tratamento e, de cada uma delas, foram retirados folíolos suficientes para impressão nos dois

meios de cultura. Todo o procedimento foi realizado de forma asséptica dentro do fluxo laminar.

As placas contendo o meio BDAY + pentabiotico, adequado para o crescimento de fungos, foram incubadas a 26°C por um período de 8 dias. Já as placas contendo o meio Agar Nutriente, adequado para crescimento de bactérias, foram incubadas a 30°C por 5 dias. Durante o período de incubação, as placas foram avaliadas diariamente quanto ao crescimento de microrganismos e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi avaliado.

3.2.2. Exposição à luz ultravioleta-C

Para testar a ação da luz ultravioleta-C na redução da microbiota da superfície das folhas, foi realizado um experimento com plantas de soja no estádio V3. As plantas foram colocadas dentro de uma câmara de fluxo laminar contendo fontes de luz UV-C (Esterilizador integrado UV-C submerso 10W – IP68, JPN, Brasil) nas partes superior e inferior, de forma que a radiação atingisse as superfícies adaxial e abaxial das folhas. As plantas foram expostas a luz UV-C por 0, 1, 5 e 10 minutos.

Na sequência foram coletados 4 folíolos de cada planta e foram processados da mesma forma que os folíolos coletados das plantas expostas ao gás ozônio nos experimentos anteriores.

3.3. Análise da colonização e persistência de conídios

Os experimentos com soja, algodão e milho foram conduzidos separadamente, seguindo os mesmos procedimentos. Após aplicação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação e avaliadas quanto ao número de colônias recuperadas da superfície foliar por grama de folha e quanto ao número de colônias recuperadas dos tecidos foliares internos por grama de folha após 1, 7, 14 e 28 dias. Cada planta foi considerada uma unidade experimental, havendo 5 repetições por tratamento para cada data de avaliação. Foram estabelecidos 4 tratamentos, sendo eles a aplicação

de solução de Tween 0,05%, de suspensão de conídios, pré-tratamento UV + Tween 0,05% e pré-tratamento UV+ suspensão de conídios.

3.3.1. Pré-tratamento com luz UV-C

Os resultados obtidos no item 3.2. "Promoção da redução da microbiota", que serão apresentados mais adiante, permitiram selecionar um método e tempo de exposição adequados ao objetivo. As plantas dos tratamentos com pré-tratamento UV, foram posicionadas dentro da câmara com fontes de luz por 5 minutos antes da aplicação de fungo ou tween 0,05%.

Plantas extras foram utilizadas para confirmar a redução da microbiota, fazendo a impressão foliar como descrita no "3.2.2. Exposição à luz ultravioleta-C (UV-C)".

3.3.2. Persistência no filoplano

Em cada data de avaliação foi coletada uma folha por planta, a qual foi pesada e transferida para 30 mL de tampão fosfato-salino (PBS) em tubos tipo Falcon e submetidas a agitação por 1 minutos em vortex e sonificação por 10 minutos em aparelho de banho ultrassônico sem aquecimento (Eco-sonics) com a finalidade de desagregar partículas aderidas a superfície foliar. Após esse procedimento, a folha foi removida do tubo Falcon, o seu conteúdo foi novamente homogeneizado em vortex e uma alíquota de 150 µl do lavado foi transferida para uma placa de Petri contendo o meio semi-seletivo de Strasser modificado, contendo peptona (10g/L), glicose (20g/L) e ágar (15g/L) com adição dos antibióticos tetraciclina (0,05g/mL), streptomina (0.6g/mL) e cicloheximida (0.05g/mL) e do fungicida Dodine (monoacetato de dodecil guanidina) (0,15g/L) (Kepler et al., 2015). O líquido foi espalhado com auxílio de uma alça de Drigalski até ser completamente absorvido pelo meio. Cada repetição foi plaqueada em duplicata. As placas foram incubadas a 26 ° C com fotofase de 12 horas. Após 10 dias, o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em cada placa foi avaliado, adotando-se o intervalo de contagem de 30-300 colônias por placa (Bennett et al., 2003). Foram feitas

lâminas de amostras das colônias para confirmar a espécie do isolado fúngico por observação em microscópio.

3.3.3. Colonização e persistência endofítica

Partindo da etapa de lavagem descrita no item anterior, cada folha lavada foi retirada do tubo Falcon e passou por um processo de esterilização superficial, ficando submersa por 30 segundos em álcool 70%, 1 minuto em hipoclorito de sódio 0,5% e lavada 3 vezes água destilada estéril. O processo de esterilização foi confirmado por meio de plaqueamento de 150 µl da última água de lavagem, bem como realizando a impressão da folha em meio de cultura BDA sem antibióticos ou antifúngicos. Na sequência as folhas foram colocadas sobre papel filtro dentro do fluxo laminar para secar. Após secas, as folhas foram maceradas com a adição PBS em quantidade equivalente a 3 vezes o seu peso. Uma alíquota de 150 µl do macerado obtido foi transferida para uma placa de Petri contendo o meio de Strasser. As placas foram incubadas a 26°C com fotofase de 12 horas. Após 10 dias foi avaliado o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) como detalhado no item anterior.

3.4. Análise da colonização e persistência de blastosporos

O Experimento foi realizado com plantas de soja em estágio v3. Após aplicação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação e avaliadas quanto ao número de colônias recuperadas da superfície foliar por grama de folha e quanto ao número de colônias recuperadas dos tecidos foliares internos por grama de folha após 1, 7, 14 e 28 dias. Cada planta foi considerada uma unidade experimental, havendo 5 repetições por tratamento para cada data de avaliação. Foram estabelecidos 6 tratamentos, sendo eles, solução de Tween 0,05%, suspensão de blastosporos, suspensão de conídios, pré-tratamento UV + Tween 0,05%, pré-tratamento UV + suspensão de blastosporos e pré-tratamento UV + suspensão de conídios.

As avaliações de colonização e persistência foram conduzidas conforme detalhado anteriormente no experimento com conídios (item 3.3. "Análise da colonização e persistência de conídios").

3.5. Análise da promoção de crescimento das plantas

As plantas de soja utilizadas nos experimentos de persistência de conídios e de blastosporos foram avaliadas quanto à massa seca em duas datas de avaliação: 1 e 28 dias após a aplicação. Após a coleta da folha utilizada para a avaliação, a planta foi cuidadosamente removida do substrato. As raízes foram lavadas e deixadas sobre papel absorvente para secar. Após secas, as plantas foram seccionadas em duas partes: raiz e parte aérea (caule, folhas e flores quando ocorreram) e foram colocadas em estufa a 60 °C por 24 horas para secagem e então pesadas em uma balança de precisão.

3.6. Análise estatística

Os dados de todos os experimentos foram inicialmente submetidos a uma análise exploratória para determinação das médias dos tratamentos, erro-padrão e "outliers" no programa "R" (R Core Team, 2022).

Os dados dos ensaios de redução da microbiota foram analisados considerando como variável dependente o número de unidade formadoras de colônia por área determinada de folha e como variável independente o tempo de exposição ao gás ozônio ou à luz ultravioleta-C. Em seguida, os dados dos experimentos foram agrupados e verificados quanto ao ajuste de modelos lineares generalizados (mlg) com diferentes famílias de distribuições. Por meio da visualização do half-normal plot, do pacote "hnp" do programa R (Moral et al., 2017), foi selecionado o modelo Normal para os dados de "Exposição ao gás ozônio I", "Exposição ao gás ozônio II" e "exposição a luz ultravioleta-C". Após o ajuste do melhor modelo, o efeito dos tratamentos foi analisado através da análise de deviance utilizando teste F. As

médias dos tratamentos foram comparadas através de contrastes ortogonais utilizando a função `glht` do pacote `Multcomp` do R, a nível de 5% de significância (Torsten et al., 2008).

Os dados dos experimentos de colonização e persistência de conídios e de blastosporos foram agrupados e verificados quanto ao ajuste de modelos lineares generalizados (mlg) com diferentes famílias de distribuições. Por meio da visualização do half-normal plot, do pacote “hnp” do programa R (Moral et al., 2017), foi selecionado o modelo Quasipoisson, considerando-se os efeitos dos tratamentos para cada data de avaliação e do tempo para cada tratamento. Após o ajuste do melhor modelo, o efeito dos tratamentos e do tempo foram verificados na análise de deviance utilizando teste X^2 . As médias dos tratamentos foram comparadas através de contrastes ortogonais utilizando a função `glht` do pacote `Multcomp` do R, a nível de 5% de significância (Torsten et al., 2008).

As medidas de crescimento das plantas foram analisadas considerando-se como variável dependente o peso seco das plantas e como variável independente os tratamentos em cada data de avaliação (1 e 28 dias). Em seguida, os dados dos experimentos foram agrupados e verificados quanto ao ajuste de modelos lineares generalizados (mlg) com diferentes famílias de distribuições. Por meio da visualização do half-normal plot, do pacote “hnp” do programa R, foi selecionado o modelo Normal. Após o ajuste do melhor modelo, o efeito de tratamento foi verificado na análise de deviance e quando significativo, as médias deles foram comparadas utilizando o teste de contrastes ortogonais, pacote `Multcomp` do R, a nível de 5% de significância.

4. Resultados

4.1. Escolha de método para redução da microbiota do filoplano

4.1.1. Exposição ao gás Ozônio

No experimento I, a exposição ao gás ozônio reduziu o número de colônias de fungos e bactérias recuperadas da superfície foliar de plantas de soja em comparação a plantas não expostas ao gás 5 ($p < 0,001$), 10 ($p < 0,001$) e 15 minutos ($p < 0,001$). Entre os tempos de exposição, não houve diferença significativa 5 e 10 minutos ($p = 0,974$ colônias de fungos; $p = 0,994$ colônias de bactérias) e 10 e 15 minutos ($p = 0,997$ colônias de fungos; $p = 0,998$ colônias de bactérias) (Figura 1A). Nos maiores tempos de exposição, 10 e 15 minutos, as plantas foram danificadas pelo ozônio e morreram dentro de 24 horas após a aplicação. As plantas que foram expostas por 5 minutos sobreviveram a esterilização, mas apresentaram danos bastante expressivos como perda de folhas e murchamento após 7 dias.

No experimento II, a exposição ao gás ozônio em condição fechada reduziu o número de colônias de fungos e bactérias recuperadas da superfície foliar de plantas de soja em comparação a plantas não expostas ao gás 1 ($p < 0,001$) e 2 minutos ($p < 0,001$). A exposição ao gás ozônio em condição aberta não reduziu o número de colônias de fungos recuperadas da superfície foliar de plantas de soja em comparação a plantas não expostas ao gás com 1 ($p = 0,19019$) e 2 minutos ($p = 0,30458$), mas apresentou efeito em bactérias com exposição de 1 ($p < 0,001$) e 2 minutos ($p < 0,001$) (Figura 1B). No experimento II, os danos causados nas plantas expostas em sistema fechado foram visivelmente menores após 24 horas, no entanto após 7 dias da exposição ao gás ozônio, as plantas apresentaram danos mais severos, como perda de folhas e murchamento. As plantas tratadas em condição aberta por 1 e 2 minutos apresentaram danos menores que os observados em condições fechadas de aplicação. No entanto foi observada uma evolução dos danos e com 7 dias após a exposição das plantas também ocorreu desfolha e amarelamento.

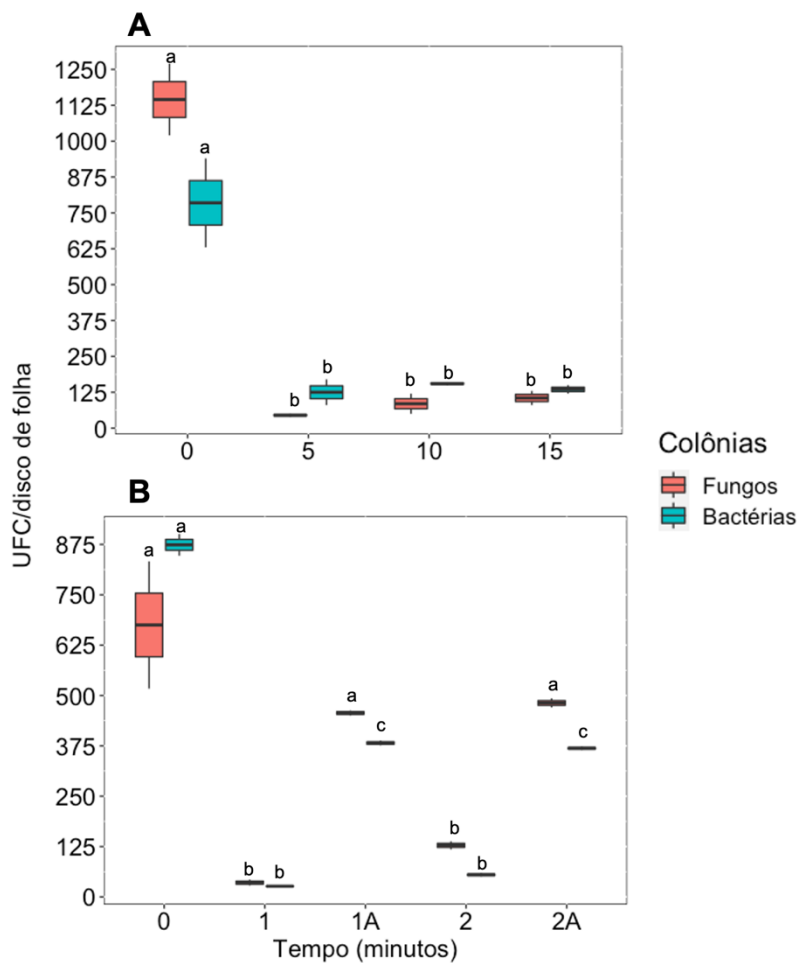


Figura 1. Médias do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por disco de folha com área determinada (12 cm^2) de soja após exposição ao gás ozônio em diferentes tempos de exposição: A: 0 (controle sem exposição ao gás ozônio), 5, 10 e 15 minutos. B: 0 (controle sem exposição ao gás ozônio), 1 minuto, 1A (1 minuto em condição aberta), 2 minutos e 2A (2 minutos em condição aberta). Tempos seguidos de letras diferentes dentro do mesmo tratamento diferem entre si pelo teste de contrastes ortogonais a 5% de significância.

4.1.2. Exposição à luz ultravioleta-C

Na figura 2 é possível observar que, em relação ao controle (plantas que não foram expostas à luz ultravioleta-C), o número de colônias de fungos e bactérias foi menor após 1 ($p < 0,001$), 5 ($p < 0,001$) e 10 ($p < 0,001$) minutos de exposição à luz UV-C. Para colônias de fungos, não houve diferença entre os tempos 5 e 10 minutos ($p = 0,231$). Não houve danos visíveis aos tecidos vegetais logo após a exposição. A observação das plantas por até 7 dias após, permitiu notar murchamento e enrugamento de algumas folhas das plantas do tratamento 10 minutos de exposição e por isso esse tempo de exposição não foi mais considerado.

Por fim considerou-se o tempo de 5 minutos de exposição à luz ultravioleta-C o mais adequado aos objetivos propostos, visto que promove uma redução de cerca de 50% do

número médio de colônias recuperadas (45% de fungos e 52% bactérias) e não causa sintomas aparentes nos tecidos vegetais imediatamente ou em até 7 dias após a exposição.

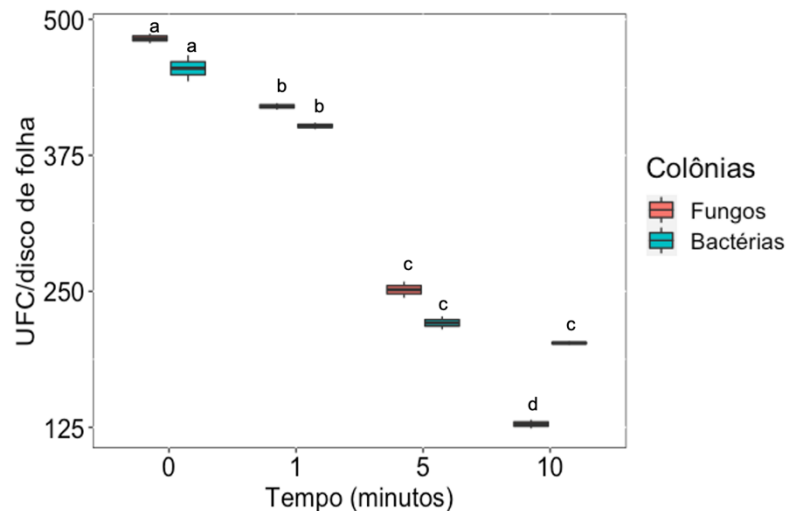


Figura 2. Médias do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por disco de folha com área determinada (12 cm² de soja após exposição à luz ultravioleta-C em diferentes tempos de exposição: 0 (controle), 1, 5 e 10 minutos. Tempos seguidos de letras diferentes dentro do mesmo tratamento diferem entre si pelo teste de contrastes ortogonais a 5% de significância.

4.2. Análise da colonização e persistência de conídios

4.2.1. Persistência no filoplano

Colônias de *B. bassiana* foram isoladas do filoplano durante todo o período de avaliação, 28 dias após aplicação, nas plantas pulverizadas com as suspensões de conídios das três culturas (Figura 3). Não foram recuperadas colônias desse fungo nas plantas em que as suspensões não foram pulverizadas.

O número de colônias recuperadas variou significativamente em função do tempo em soja ($X^2_{[29]}=965515$, $p<0,001$), algodão ($X^2_{[29]}=717320$, $p<0,001$) e milho ($X^2_{[37]}=613341$, $p<0,001$).

Em plantas de soja, uma grande redução foi observada em ambos os tratamentos aos 7 dias após aplicação, sendo as médias 91% e 93% menores em relação à avaliação de 1 dia após aplicação, respectivamente em plantas com

aplicação de conídios somente ($p < 0,001$) e plantas que foram expostas a luz UV-C antes de aplicação de conídios ($p < 0,001$). Não houve diferença no número de colônias para plantas somente tratadas com conídios e plantas expostas a luz UV-C antes da aplicação de conídios entre as datas de avaliação 7 e 14 dias ($p=0,256$ e $p=0,909$, respectivamente) e 14 e 28 dias ($p= 0,973$ e $p=0,994$, respectivamente). Observou-se maiores números médio de colônias por grama de folha no tratamento pulverizado com conídios em plantas que não receberam tratamento com UV ($4,4 \pm 0,5 \times 10^5$; média \pm SE) em relação ao tratamento em que as plantas foram expostas a luz UV-C antes da pulverização dos conídios (UV + conídios) ($2,4 \pm 0,3 \times 10^5$) ($p < 0,001$). Não houve diferença entre estes tratamentos nas avaliações dos dias 7 ($p=0,704$), 14 ($p=0,956$) e 28 ($p=0,928$) (figura 3A)

Nas plantas de algodão também foi observada uma redução expressiva no número de colônias recuperadas do filoplano entre 1 e 7 dias da aplicação de suspensão de conídios, para plantas que receberam ou não o pré-tratamento UV-C ($p < 0,001$). O número médio de colônias recuperadas por grama de folha no dia 7 representa cerca de 7% e 11% (plantas aplicadas com suspensão de conídios sem exposição a luz UV-C e com exposição a luz UV-C, respectivamente) em relação as médias encontrada na avaliação do dia 1. Não houve diferença no número de colônias entre 7 e 14 dias ($p=0,726$ e $p= 0,500$) e 14 e 28 dias ($p=0,999$ e $p=0,884$) entre as plantas somente aplicadas com suspensão de conídios e aquelas que passaram pelo pré-tratamento UV-C antes da aplicação. Além disso, não foi observado efeito do tratamento com UV em relação ao controle sem UV sobre o número de colônias recuperado dos filoplano, 1 ($p=0,634$), 7 ($p=0,704$), 14 ($p=0,956$) e 28 dias ($p= 0,928$) após a aplicação. (figura 3B).

Nas plantas de milho, observou-se efeito do tempo somente em plantas que não foram expostas à luz UV-C, nas quais 1 dia após a aplicação foram recuperadas $4,1 \pm 0,7 \times 10^5$ colônias por grama de folha e com 7 dias $4,2 \pm 0,9 \times 10^4$ colônias por grama de folha ($p < 0,001$), média 90% menor. Não houve diferença entre os dias 7 e 14 ($p=0,1954$) e 14 e 28 ($p=0,6486$) para esse tratamento. Já o tratamento em que as plantas foram pré-tratadas com luz UV-C não apresentou uma brusca redução, visto que não houve diferença significativa entre as datas de avaliação 1 e 7 ($p=0,0925$), 7 e 14 ($p=0,5584$), e 14 e 28 ($p=0,9571$) dias. Entre os tratamentos, foi observada diferença na avaliação 1 dia após a aplicação da suspensão de conídios,

na qual foram recuperadas $4,1 \pm 0,7 \times 10^5$ (média \pm SE) colônias por grama de folha nas plantas que não expostas à radiação, em comparação com $5,5 \pm 1,5 \times 10^4$ colônias por grama de folha nas plantas expostas à radiação antes da pulverização da suspensão de conídios ($p < 0,001$). Os tratamentos não diferiram nas avaliações de 7 ($p = 0,2663$), 14 ($p = 0,6877$) e 28 dias ($p = 0,9041$) (Figura 3C).

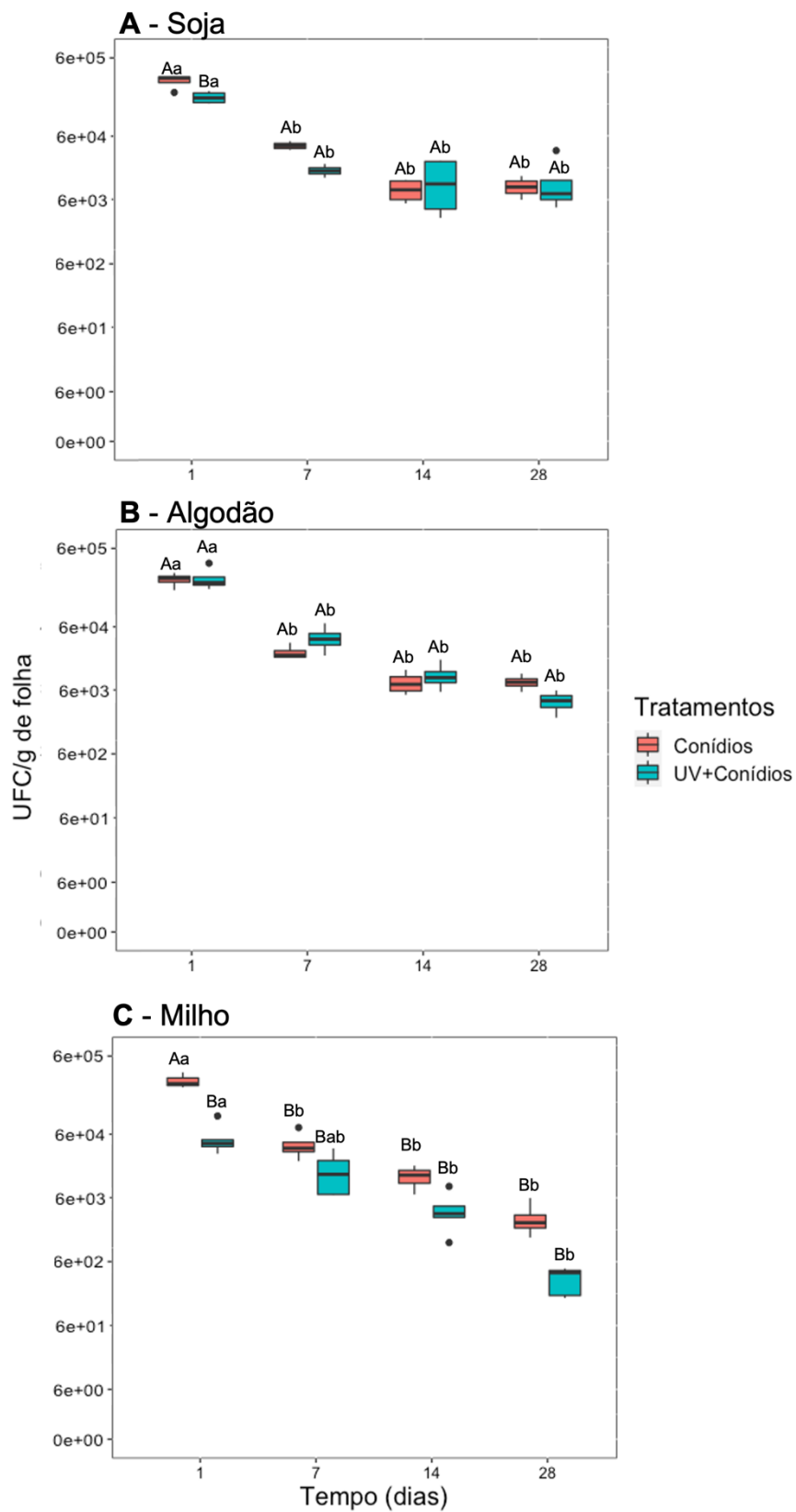


Figura 3. Médias do número de Unidades Formadoras de Colônia de *Beauveria bassiana* por grama de folha (UFC/g de folha) no filoplano por data de avaliação: 1, 7, 14 e 28 dias após aplicação de conídios. Tratamentos seguidos de letras maiúsculas diferentes diferem entre si na mesma data de avaliação e letras minúsculas diferentes revelam diferenças nos tempos para dentro do mesmo tratamento pelo teste de contrastes ortogonais a 5% de significância. **A.**

Experimento com plantas de soja. **B.** Experimento com plantas de algodão. **C.** Experimento com plantas de milho.

4.2.2. Colonização e persistência endofítica

Colônias de *B. bassiana* foram isoladas de tecidos internos de plantas durante todo o período de avaliação, 28 dias, nas três culturas avaliadas nas plantas pulverizadas com a suspensão de conídios com ou sem o pré-tratamento de exposição à luz UV-C (Figura 4). Não foram recuperadas colônias desse fungo nas plantas em que a suspensão não foi pulverizada.

O número de colônias variou significativamente ao longo do tempo em soja ($X^2_{[29]}=1163,0$, $p<0,001$), algodão ($X^2_{[26]}=11142,6$, $p<0,001$) e milho ($X^2_{[37]}=2741,0$, $p<0,001$).

Em plantas de soja, para ambos os tratamentos, o maior número médio de colônias foi encontrado 1 dia após a aplicação (543 ± 145 e 443 ± 22 colônias por grama de folha nas plantas pulverizadas sem exposição a luz UV-C e com a exposição previa à luz, respectivamente; média \pm SE). Aos 7 dias após a aplicação os números médios de colônias recuperadas de tecidos internos em ambos os tratamentos foram significativamente menores em relação a avaliação anterior ($p<0,001$ em plantas sem exposição à UV-C e $p=0,037368$ em plantas expostas à UV-C antes da pulverização). Não houve diferença estatística entre as datas de avaliação 7 e 14 dias para ambos os tratamentos ($p=0,335790$ e $p=0,073337$, respectivamente em plantas não expostas e expostas a luz UV-C antes da pulverização). Aos 28 dias após a aplicação, o número de colônias por grama de folha foi menor que o encontrado aos 7 dias ($p= 0,011426$ tratamento sem exposição à UV-C e $p= 0,000357$ tratamento com exposição à UV-C antes da pulverização), mas não apresentou diferença em relação aos 14 dias ($p=0$ e $p=0,075152$, na mesma ordem) (figura 4A). Não houve diferença significativa entre plantas com o pré-tratamento UV-C e plantas sem o pré-tratamento 1 ($p=0,179257$), 7 ($p=0,370592$), 14 ($p=0,946460$) e 28 dias ($p=0,884319$) após a aplicação (Figura 4A).

Nas plantas de algodão, para ambos os tratamentos, o maior número médio de colônias foi observado 1 dia após a aplicação ($1,5 \pm 0,4 \times 10^3$ e $3,0 \pm 0,3 \times 10^3$

colônias por grama de folha nos tratamentos sem e com exposição prévia à UV-C, respectivamente) e tiveram redução significativa no número médio de colônias após 7 dias ($p < 0,001$ e $p = 0,037368$). Na avaliação de 14 dias, as plantas que não foram expostas à luz UV-C não apresentaram diferença significativa em relação à avaliação anterior, 7 dias, ($p = 0,071366$). Aos 28 dias esse tratamento diferiu da avaliação dos 14 dias ($p = 0,043907$), mas não da avaliação de 7 dias ($p = 0,729650$). Já as plantas que foram expostas à luz UV-C antes da pulverização apresentaram diferença estatística entre as avaliações de 7 e 14 dias ($p = 0,020580$), mas não entre 14 e 28 dias após aplicação ($p = 0,704236$). Houve diferença entre os dois tratamentos apenas na avaliação de 1 dia após a aplicação, sendo que o tratamento com pré-tratamento UV-C apresentou maior número médio de colônias recuperadas de tecidos internos por grama de folha ($3,0 \pm 0,3 \times 10^3$ em contraste com $1,5 \pm 0,4 \times 10^3$ colônias por grama de folha no tratamento sem a exposição; $p < 0,001$). Nas avaliações de 7 ($p = 0,357285$) e 14 dias ($p = 0,151852$) após aplicação os tratamentos não diferiram entre si e na avaliação de 28 dias a diferença voltou a aparecer ($p = 0,000221$), sendo o tratamento sem exposição à UV-C com maior número de colônias por grama de folha (795 ± 319 em contraste com 95 ± 34 colônias por grama de folha em plantas pré-tratadas com UV-C) (Figura 4B).

No experimento com plantas de milho a maior redução foi observada entre as avaliações 1 e 7 dias após aplicação em ambos os tratamentos ($p < 0,001$). Nas datas posteriores de avaliação não foi observada diferença estatística em plantas pulverizadas sem o pré-tratamento UV-C entre 7 e 14 dias $p = 0,130204$ e entre 14 e 28 dias $p = 0,153940$. O mesmo foi observado nas plantas expostas à radiação antes da pulverização: entre 7 e 14 dias $p = 0,453016$ e entre 14 e 28 dias $p = 0,091336$. Com 1 dia após aplicação, o tratamento sem exposição à luz UV-C apresentou o maior número de colônias por grama de folha ($1,5 \pm 0,1 \times 10^3$) em relação àquelas que foram expostas ($7,9 \pm 3,5 \times 10^2$). Nos demais dias de avaliação 7 ($p = 0,206529$), 14 ($p = 0,616889$) e 28 dias ($p = 0,445522$) não houve diferença estatística entre os tratamentos (Figura 4C).

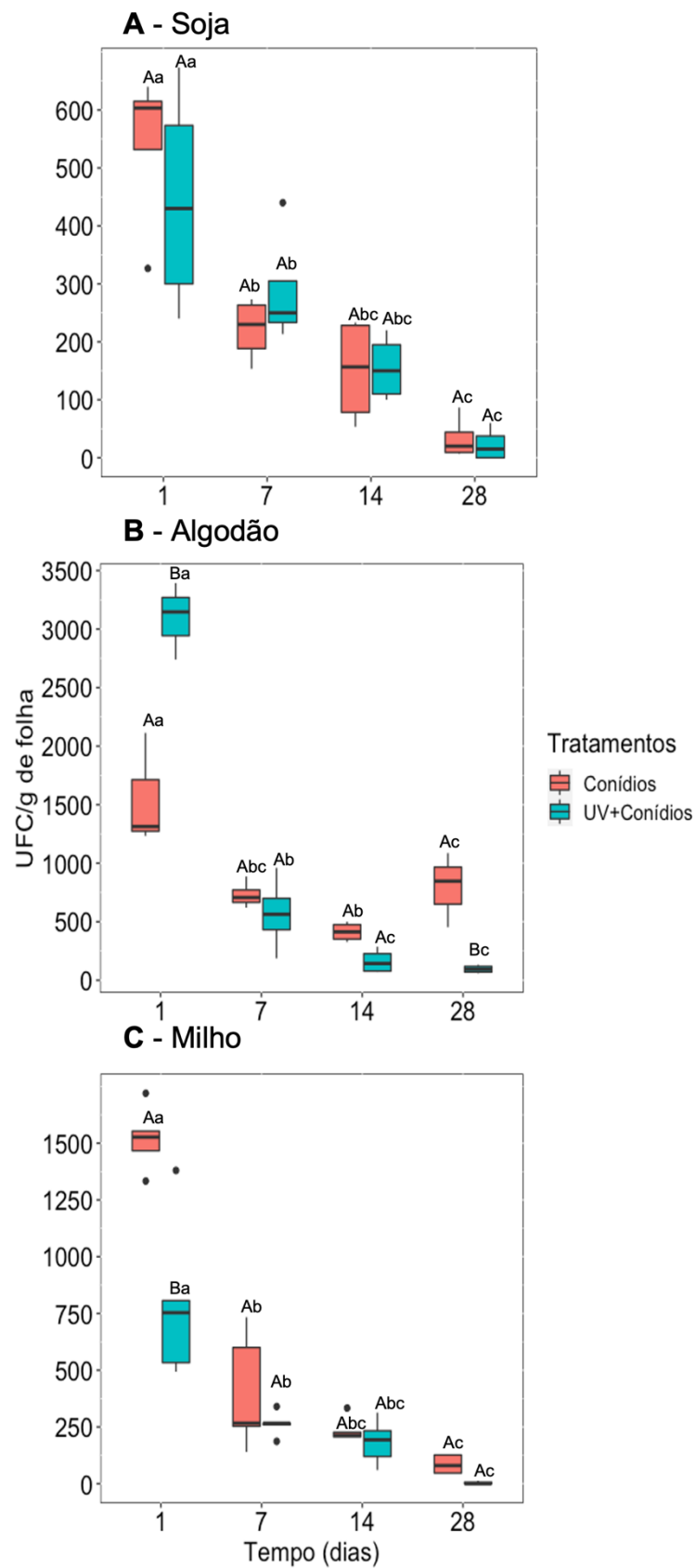


Figura 4. Médias do número de Unidades Formadoras de Colônia de *Beauveria bassiana* por grama de folha (UFC/g de folha) nos tecidos internos por data de avaliação: 1, 7, 14 e 28 dias após aplicação de conídios. Tratamentos seguidos de letras maiúsculas diferentes dentro da mesma data de avaliação diferem entre si e tempos seguidos de letras minúsculas diferentes

dentro do mesmo tratamento diferem entre si pelo teste de contrastes ortogonais a 5% de significância. **A.** Experimento com plantas de soja. **B.** Experimento com plantas de algodão. **C.** Experimento com plantas de milho.

4.3. Análise da colonização e persistência de blastosporos

Colônias de *B. bassiana* foram isoladas do filopiano e de tecidos internos de plantas de soja pulverizadas com conídios ou blastosporos durante todo o período de avaliação, 28 dias após aplicação (Figura 5). Não foram recuperadas colônias desse fungo nas plantas que não foram pulverizadas com a suspensão.

O número de colônias recuperadas do filopiano em folhas de soja variou significativamente em função dos tratamentos ($X^2_{[60]}=14347636$, $p=0,04755$) e do tempo ($X^2_{[59]}=2605869$, $p<0,001$). Uma grande redução no número de colônias por grama de folha foi observada entre as datas de avaliação 1 e 7 dias em todos os tratamentos ($p<0,001$ tratamento Blastosporos; $p<0,001$ tratamento Conídios; $p<0,001$ tratamento UV+blastosporos; $p=0,002543$ tratamento UV+conídios). Nenhum tratamento apresentou diferença significativa entre as avaliações 7 e 14 ($p=0,419241$; $p=0,654352$; $p=0,765256$; $p=0,964072$) e entre 14 e 28 dias ($p=0,577370$; $p=0,989328$; $p=0,776810$; $p=0,997445$), dados apresentados na sequencia para plantas em que foram pulverizadas suspensões de blastosporos e de conídios sem exposição à luz UV-C e de blastosporos e conídios com exposição prévia à UV-C. No primeiro dia de avaliação (1 dia após a aplicação), as plantas com pré-tratamento UV-C seguido de pulverização de conídios apresentaram menor número de colônias de *B. bassiana* por grama de folha ($2,4 \pm 0,2 \times 10^5$) em relação aos demais tratamentos ($p=0,000603$) em relação a aplicação de blastosporos; $p=0,008886$ em relação a plantas aplicadas com conídios sem prévia exposição à UV-C; $p=0,000245$ em relação a blastosporos com prévia exposição à UV-C). Nas demais datas de avaliação (7, 14 e 28 dias após aplicação) os tratamentos não apresentaram diferença estatística (figura 5A).

Na análise da colonização endofítica observou-se que houve efeito dos tratamentos ($X^2_{[60]}=19425$, $p<0,001$ e do tempo ($X^2_{[59]}=5530$, $p<0,001$). O tratamento com aplicação de blastosporos apresentou a maior média de colônias de *B. bassiana* por grama de folha nas datas de 1 ($1,8 \pm 0,1 \times 10^3$), 7 ($1,0 \pm 0,2 \times 10^3$) e 14 ($8,1 \pm 2,7 \times 10^2$) dias após aplicação. Na avaliação de 1 dia após a aplicação, a

segunda maior média foi a do tratamento em que houve exposição à luz UV-C antes da aplicação de blastosporos ($1,0 \pm 0,2 \times 10^3$ colônias de *B. bassiana* por grama de folha), seguida pelas médias dos tratamentos com aplicação de conídios (com e sem pré-tratamento UV-C) que não diferiram entre si ($p=0,564819$). Nas avaliações de 7 e 14 dias, os tratamentos de aplicação de conídios sem exposição à UV-C e conídios e blastosporos com exposição prévia à UV-C não diferiram entre si. Aos 28 dias os 4 tratamentos comparados não apresentaram diferença entre si (Figura 5B).

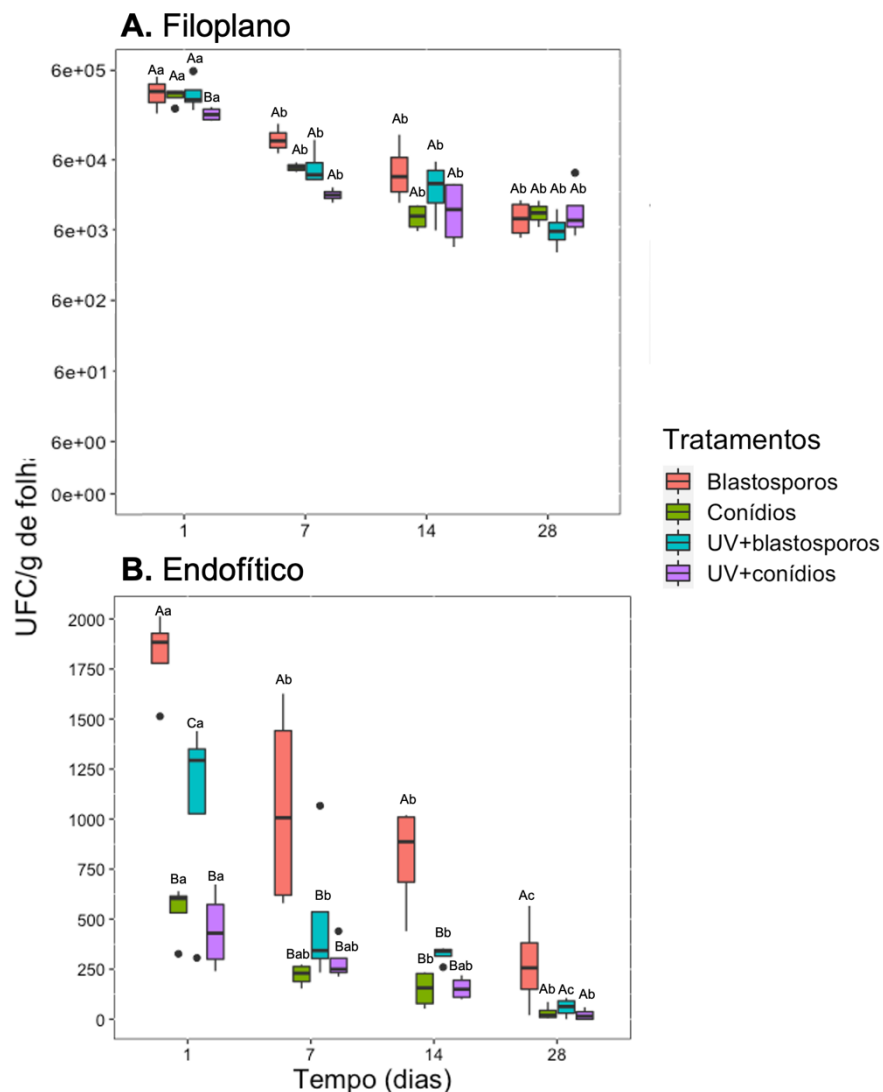


Figura 5. Médias do número de Unidades Formadoras de Colônia de *Beauveria bassiana* por grama de folha (UFC/g de folha) nos tecidos internos **(A)** e filoplano **(B)** por data de avaliação: 1, 7, 14 e 28 dias após aplicação. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes dentro da mesma data de avaliação diferem entre si e médias seguidas de letras minúsculas diferentes dentro do mesmo tratamento diferem entre si ao longo do tempo pelo teste de contrastes ortogonais a 5% de significância.

4.4. Análise da promoção de crescimento da planta

O peso seco de raiz ($p= 0,5547$), parte aérea ($p=0,4612$) ou total ($p=0,6241$) das plantas de soja 1 dia após a aplicação de suspensão de conídios, blastosporos ou solução de tween (controle) não diferiram significativamente (dados não apresentados). Dessa forma, foi considerado que as plantas possuíam o mesmo tamanho no momento da aplicação.

Após 28 dias da aplicação dos tratamentos, as plantas pulverizadas com blastosporos ($2,37\pm 0,28$ g) ou conídios ($2,37\pm 0,22$ g) apresentaram as maiores médias de peso seco de raiz do que os controles (Tween e UV + Tween), não diferindo do tratamentos onde os propágulos foram aplicados após o tratamento com UV ($2,19\pm 0,17$ tratamento UV+blastosporos e $1,73\pm 0,17$ tratamento UV+conídios) (Tabela 1). O peso seco da parte aérea e o peso seco total apresentaram as mesmas diferenças estatísticas. As plantas pulverizadas com blastosporos ou conídios com ou sem o pré-tratamento das folhas com UV apresentaram maiores médias de peso do que os controles.

Tabela 1. Peso seco (P. seco) de raiz, parte aérea e total de plantas de soja 28 dias após aplicação. Média \pm erro padrão seguidos de letras diferentes dentro da mesma coluna diferem entre si pelo teste contrastes ortogonais, pacote Multcomp do R, a nível de 5% de significância.

Tratamento	P. seco raiz (g)	P. seco parte aérea (g)	P. seco total (g)
Blastosporo	2,37 \pm 0,28 a	4,84 \pm 0,76 a	7,25 \pm 1,09 a
Conídios	2,37 \pm 0,22 a	5,20 \pm 0,79 a	7,58 \pm 1,07 a
Tween	1,06 \pm 0,37 b	1,49 \pm 0,28 c	2,55 \pm 0,63 c
UV+blastosporos	2,19 \pm 0,17 a	4,14 \pm 0,78 ab	6,33 \pm 0,65 ab
UV+conídios	1,73 \pm 0,17 ab	4,70 \pm 0,19 a	6,43 \pm 0,24 a
UV+tween	1,12 \pm 0,06 b	2,34 \pm 0,06 bc	3,46 \pm 0,02 bc

5. Discussão

Esse trabalho teve o objetivo de contribuir para elucidar aspectos da ação multifuncional do fungo entomopatogênico *B. bassiana*. Embora o tema venha sendo explorado com ênfase nos últimos anos, sente-se a necessidade de padronização de métodos, conexão entre os resultados e respostas quantitativas em relação à ecologia do fungo no agroecossistema (McKinnon et al., 2017). A sobrevivência na superfície foliar, bem como a colonização endofítica persistentes por até 28 dias em diferentes plantas é uma informação de grande valor teórico e aplicado. Além disso, as informações sobre persistência de blastosporos nunca foram antes relatadas e são bastante relevantes visto que demonstraram uma maior capacidade de colonização endofítica desse propágulo em relação aos conídios, tradicionalmente utilizados. Esse fato fomenta a ideia de desenvolvimento de novos produtos à base de blastosporos.

A sobrevivência do fungo no filoplano é considerada um grande desafio, visto que representa um ambiente potencialmente estressante, exposto a condições bióticas e abióticas adversas (Chaudhry et al., 2021). A grande quantidade de UFC encontradas após 1 dia da aplicação é possível detectar muitos propágulos viáveis em todas as espécies de plantas avaliadas. Após essa data, ocorreu acentuada queda observada no número de UFC que pode ser explicada pela hipótese de parte dos propágulos terem penetrado nos tecidos vegetais, tornando-se endofíticos ou simplesmente tornarem-se inviáveis por conta das condições, já citadas, inadequadas a seu desenvolvimento. No entanto, números menores, mas ainda expressivos de UFC foram recuperadas da superfície até 28 dias após a aplicação. Mesmo as plantas não tendo sido mantidas em condições de campo o período residual deste agente de controle é interessante, precisando ainda ser avaliado seu efeito potencial sobre pragas que possam visitar a planta após a aplicação. A quantidade média de UFC encontrada por grama de folha 28 dias após a aplicação variou de $3,0 \pm 0,7 \times 10^3$ a $9,0 \pm 1,0 \times 10^3$ entre as plantas de algodão, milho e soja (considerando conídios e blastosporos para a última). No Mesmo que esta concentração não seja letal para a maioria dos insetos as baixas concentrações do fungo podem causar efeitos subletais como os efeitos negativos na longevidade, taxa intrínseca de crescimento e taxa líquida de reprodução . É necessário ainda,

considerar qual tipo de estrutura está presente na superfície das folhas após tantos dias passados. Para que consiga penetrar no tegumento de insetos é preciso que estejam em formas infectivas - conídios e blastosporos - no entanto há a possibilidade que o fungo tenha sobrevivido em forma de hifas, sendo necessárias avaliações com uso de microscopia para responder a essa questão.

A capacidade de *B. bassiana* de colonizar tecidos internos de plantas já foi amplamente demonstrada, tanto em ocorrências naturais quanto por diferentes métodos de inoculação (McKinnon et al., 2017). Além de confirmar a colonização endofítica via aplicação foliar em soja, algodão e milho, o presente estudo trouxe uma importante informação em relação à rapidez em que isso ocorre, encontrando quantidades consideráveis de UFC nos tecidos internos das três espécies 24 horas após a aplicação. Acredita-se que aberturas naturais como os estômatos possam facilitar o processo de colonização endofítica, mas não é a única maneira que isso ocorre. Em folhas de milho, por exemplo, foi observado que hifas (ou conídios germinados) crescem e penetram células epidérmicas de forma aleatória por toda a área de superfície foliar (Wagner e Lewis, 2000). Para afirmar quais formas fúngicas se estabelecem nos tecidos internos das plantas após a penetração, análises histológicas seriam necessárias e, embora a maior parte dos estudos relatem a ocorrência em forma de hifas, a ocorrência de conídios também já foi registrada em tecidos vasculares de plantas por Maketon et al. (2013) e Wagner e Lewis (2000).

Ao longo do tempo, observou-se uma queda na quantidade de UFC recuperadas internamente, mas não de forma tão acentuada quanto observada na filoplano. Essa comparação indica que o interior da folha representa um ambiente mais favorável à sobrevivência do fungo. A colonização e persistência endofítica é especialmente interessante, pois muitos benefícios relacionados a essa associação já foram relatados para *B. bassiana*, como efeitos negativos diretos na reprodução, longevidade e alimentação de herbívoros associados em experimentos de laboratório, estufa e em campo (McKinnon et al., 2017). A promoção de crescimento relacionada a colonização endofítica de *B. bassiana* também já foi relatada em diversos estudos para plantas de algodão (Lopez e Sword, 2015), de milho (Tall & Meyling, 2018) e soja (Russo et al., 2018), essa última também foi demonstrada no presente estudo, onde ambos os propágulos testados resultaram em plantas com maior biomassa em relação ao controle 28 dias após a aplicação. Outro efeito

decorrente da colonização endofítica é a indução de resistência, causada por uma resposta da planta que, inicialmente reconhece o fungo como potencial invasor e desencadeia uma resposta imune (Vos et al., 2015).

A associação desses numerosos efeitos positivos com informações do tempo de persistência endofítica agregam valor ao uso de fungos entomopatogênicos, em especial ao isolado de *B. bassiana* utilizado nesse trabalho (ESALQ PL63), que é utilizado como princípio ativo de produtos comerciais já consolidados no mercado, sendo de grande utilização em diversas culturas.

O uso comercial de *B. bassiana*, assim como das outras espécies de fungos entomopatogênicos comercializadas no Brasil, é restrito à forma de conídios aéreos. Na área da pesquisa, por sua vez, a utilização de blastosporos já vem sendo explorada e mostra resultados promissores a exemplo do trabalho de Corrêa et al. (2020) em que blastosporos de um isolado de *B. bassiana* foram mais eficazes na mortalidade de três importantes pragas de soja: *Bemisia tabaci*, *Spodoptera frugiperda* e *Chrysodeixis includens*. Os resultados apresentados aqui, mostram que blastosporos sobrevivem em tecidos internos em quantidade superiores em relação aos conídios até 14 dias após a aplicação, sendo um fator adicional às vantagens de se utilizar esse propágulo no desenvolvimento de novos produtos.

No experimento de redução da microbiota do filoplano, ambos os métodos testados, exposição a gás ozônio e luz ultravioleta-C, resultaram em redução da microbiota. No entanto foi preciso considerar que as plantas do experimento seriam avaliadas até 28 dias após a aplicação e que, portanto, seria necessário que estivessem sem danos em seus tecidos por todo esse período, para que o resultado das avaliações não fosse comprometido. Assim, a exposição ao gás ozônio tornou-se inviável dado a severidade de danos causados no tecido foliar, bem como períodos mais longos de exposição à luz ultravioleta-C. O tempo de 5 minutos de exposição à luz ultravioleta-C se adequou aos fins propostos. A utilização de dois meios de cultura e incubação em diferentes temperaturas buscou abranger o maior número de espécies possíveis dentro da limitação de organismos que são cultiváveis. Pode-se considerar esse um método básico, que expressa os efeitos em uma parte da microbiota apenas. Para resultados mais detalhados faz-se necessário a utilização de métodos independentes de cultura como as tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) (Massart et al., 2015).

A redução da microbiota não se mostrou benéfica à colonização inicial de conídios - considerando-se o número de UFC 1 dia após a aplicação - no filoplano e em tecidos internos das plantas e tendeu a tornar-se indiferente em relação à persistência nas demais datas de avaliações. É possível que a redução da microbiota obtida com o UV não tenha sido grande o suficiente ou a redução obtida tenha sido apenas transitória, sendo possível que a microbiota tenha se reestabelecido após a exposição à luz UV-C. Por essa perspectiva, reforça-se a importância da microbiota para a planta e a necessidade de avanços em pesquisas que abordem a planta e microbiota em conjunto e explorem a complementaridade metabólica (Müller et al., 2016). Uma outra possibilidade seria a de que a exposição à luz UV-C tenha promovido uma indução de resistência nas plantas, conforme observado em plantas de morango por Xu e colaboradores (2019). Nesse caso, o sistema de defesa da planta pode ter identificado a colonização como uma invasão de patógenos. Outro fato que corrobora para essa hipótese é a maior colonização endofítica de blastosporos em relação a conídios em plantas de soja, visto que algumas características desse propágulo são adaptadas para escapar das defesas imunes e explorar os nutrientes do hospedeiro, tais como parede celular delgada e cargas eletrostáticas na superfície celular (Holder et al. 2007).

Os métodos de persistência de *B. bassiana*, incluem também a transmissão de um indivíduo a outro, podendo manter-se, ao mesmo tempo, como endofítico e epifítico (sobre tecidos externos) (Santamaría & Bayman, 2005). Esse fato, somado ao método de aplicação do microrganismo para promoção da colonização endofítica precisam ser levados em consideração no momento de recuperação dos tecidos internos. Aplicações foliares, como realizada nesse trabalho, exigem técnicas apropriadas para a esterilização da superfície das folhas, de modo a garantir que propágulos fúngicos presentes nos tecidos externos sejam eliminados e não sejam considerados como endofíticos. No trabalho de McKinnon et al. (2017) verificou-se que a maioria dos trabalhos que abordam isolamento de fungos endofíticos realiza algum tipo de esterilização da superfície utilizando principalmente álcool (etanol 70 a 96%) e hipoclorito de sódio (0,04 a 6%). O grande problema detectado no estudo citado é que na maior parte dos trabalhos (34 de 55 analisados) não são adotados quaisquer métodos de verificação da esterilização superficial. E dentre os 21 que fizeram algum tipo de confirmação, apenas 5 adotaram o método de Schulz et al.

(1998), que consiste em imprimir a folha que foi esterilizada diretamente em meio de cultivo sólido apropriado ao crescimento do microrganismo em questão. Para o presente estudo as folhas foram imersas em tampão fosfato-salino (PBS) e submetidas a agitação e banho ultrassônico afim de soltar os propágulos aderidos à superfície. Adotou-se na sequência o protocolo de esterilização por imersão em álcool 70%, hipoclorito de sódio 0,5% por tempos testados e adequados às espécies vegetais utilizadas e em água destilada estéril por 3 vezes. Para confirmação da esterilização foram adotados em conjunto os métodos de plaqueamento de uma alíquota da última água de esterilização e a impressão foliar em meio sólido. Assim, elimina-se quaisquer dúvidas em relação a origem endofítica das colônias isoladas.

6. Conclusão

Beauveria bassiana persiste em plantas de soja, algodão e milho tanto no filoplano, como em tecidos internos por até 28 dias. Os blastosporos foram mais efetivos na colonização endofítica de soja, em comparação com conídios. A redução da microbiota não foi um fator positivo para colonização, salientando que esses microrganismos, essenciais às plantas, atuam de forma compatível com a utilização desse fungo para controle biológico.

Esses resultados contribuem de forma prática com informações relevantes ao desenvolvimento de produtos que explorem novos propágulos, além dos conídios. Auxilia, também, na tomada de decisão no manejo de pragas e doenças, acrescentando informações sobre a persistência de *B. bassiana* no agroecossistema e abrindo a possibilidade de inclusão desse organismo no calendário de aplicações visto que sua múltipla atuação é bastante desejável em campo.

Pela ótica da pesquisa, esse trabalho colabora com a busca de padronização de métodos para recuperação endofítica, reforça a importância de estudos que considerem a interação multitrófica entre plantas, sua microbiota e agentes de controle biológico e traz resultados inéditos em relação à colonização de plantas por blastosporos.

Referencias

- Abrapa - Associação Brasileira dos Produtores de Algodão (2022). Disponível em: <https://www.abrapa.com.br/Paginas/default.aspx>. Acesso em 15 maio 2022.
- Agrofit - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário. Consulta aberta (2022). Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 28 mai 2022.
- Agrolink - O Portal do Conteúdo Agropecuário. **Histórico da soja** (2020). Disponível em: https://www.agrolink.com.br/culturas/soja/informacoes/historico_361541.html. Acesso em 26 ago 2022
- Ahmad, I., Jiménez-Gasco, M. del M., Luthe, D. S., Shakeel, S. N., Barbercheck, M. E. (2020). **Endophytic *Metarhizium robertsii* promotes maize growth, suppresses insect growth, and alters plant defense gene expression.** *Biological Control*, 144(2), 104-167. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104167>
- Alves, S.B. (1986). **Controle Microbiano de Insetos.** Manole, São Paulo, SP, Brasil.
- Amobonye A., Bhagwat P., Pandey A., et al. (2020). **Biotechnological potential of *Beauveria bassiana* as a source of novel biocatalysts and metabolites.** *Critical Reviews in Biotechnology*, 40, 1019–1034.
- Bennett, A.J., Leifert, C., Whipps, J.M. (2003). **Survival of the biocontrol agents *Coniothyrium minitans* and *Bacillus subtilis* MBI 600 introduced into pasteurised, sterilised and non-sterile soils.** *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 1565-1573.
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., & Maguin, E. (2020). **Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges.** 1–22.
- Bioseta - **Conheça o processo da ação germicida das lâmpadas UVC.** (2021). Disponível em: <https://www.bioseta.com.br/conheca-o-processo-da-acao-germicida-das-lampadas-uvc/>. Acesso em: 06 jul. 2022.
- Bowers, R. M., Lauber, C.L., Wiedinmyer, C., et al. (2009) **Characterization of airborne microbial communities at a high-elevation site and their potential to act as atmospheric ice nuclei.** *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5121–5130. <https://doi.org/10.1128/AEM.00447-09>

- Butt, T.M., Coates, C.J., Dubovskiy, I.M., Ratcliffe, N.A. (2016). **Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions**. *Adv. Genet*, 94, 307–364. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.006>
- Cepea - Centro De Estudos Avançados Em Economia Aplicada (2022). **PIB do Agronegócio Brasileiro**. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acesso em: 16 maio 2022.
- Chaudhry, V., Runge, P., Sengupta, P., Doehlemann, G., Parker, J. E., Kemen, E. (2021). **Shaping the leaf microbiota: Plant-microbe-microbe interactions**. *Journal of Experimental Botany*, 72(1), 36–56. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa417>
- Cliquet, S., Jackson, M.A. (1997) **Comparison of air-drying methods for evaluating the desiccation tolerance of liquid culture-produced blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus***. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, 299–303. <https://doi.org/10.1023/A:1018535124352>
- Croplife (2021). **Cresce a adoção de produtos biológicos pelos agricultores brasileiros**. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/noticias/cresce-a-adocao-de-produtos-biologicos-pelos-agricultores-brasileiros/> Acesso em: 16 maio 2022.
- Delmotte, N.L., Knief, C., Chaffron, S., et al. (2009). **Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria**. *Biological Sciences*, 106 (38), 16428-16433. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905240106>
- Garrido-jurado, I., Resquín-romero, G., Amarilla, S. P., Ríos-moreno, A., Carrasco, L., Quesada-moraga, E. (2016). **Transient endophytic colonization of melon plants by entomopathogenic fungi after foliar application for the control of *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae)**. *Journal of Pest Science*, 90, 319–339. <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0767-2>
- Gayán, E., Condón, S., Álvarez, I. (2014). **Biological Aspects in Food Preservation by Ultraviolet Light: A Review**. *Food and Bioprocess Technology*, 7 (1), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1168-7>
- Gran-Milho (2022). **Milho e soja, por que eles vendem no mundo todo?** Disponível em: <https://granmilho.com.br/milho-e-soja-por-que-eles-vendem-no-mundo-todo/>. Acesso em: 04 jul. 2022.
- Gurulingappa, P., Sword, G.A., Murdoch, G., McGee, P.A. (2010). **Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta**. *Biological Control*, 55, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.06.011>

- Halfeld-Vieira, Almeida, B., *et al.* (2016). **Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas.** Embrapa.
- Hirano, S.S., Upper, C.D. (2000) **Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae* -a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte.** *Microbiol Mol Biol*, 64(3), 624-53. <https://doi: 10.1128/MMBR.64.3.624-653.2000>
- Holder, D.J., Kirkland, B.H., Lewis, M.W., Keyhani, N.O. (2007) **Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*.** *Microbiology*, 153, 3448–3457. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/008524-0>
- Iwanicki, N.S.A., Ferreira, B. de O., Mascarin, G.M., Júnior, I.D. (2018) **Modified Adamek’s medium renders high yields of *Metarhizium robertsii* blastospores that are desiccation tolerant and infective to cattle-tick larvae.** *Fungal Biology*, 122, 883–890. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.05.004>
- Jaber, L. R., Ownley, B. H. (2018). **Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens?** *Biological Control*, 116, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.018>
- Khan, A.L., Hamayun, M., Khan, S.A., *et al.* (2012) **Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1483–1494. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0950-9>
- Koppert. **Produtos e Soluções.** Disponível em: <https://www.koppert.com.br/produtos-e-solucoes/>. Acesso em: 16 maio 2022.
- Lambais, M.R., Crowley, D.E., Cury, J.C., *et al.* (2006). **Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic Forest.** *Science*, 312:1917. <https://doi.org/10.1126/science.1124696>
- Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N. (2009). **Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale.** *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5111–5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.00335-09>
- Lindblad, M., Tano, E., Lindahl, C., Huss, F. (2020). **Ultraviolet-C decontamination of a hospital room: Amount of UV light needed.** *Burns*, 46(4), 842–849. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2019.10.004>

- Lindow, S. E., Brandl, M. T. (2003). **Microbiology of the phyllosphere**. Applied and Environmental Microbiology, 69(4), 1875–1883. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003>
- Lopez, D.C., Sword, G.A. (2015) **The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*)**. Biological Control, 89, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.03.010>
- Mascarin, G. M., Jackson, M. A., Kobori, N. N., Behle, R. W., Delalibera Júnior, I. (2015). **Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains**. Journal of Invertebrate Pathology, 127, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.001>
- Mascarin, G.M., Jackson, M.A., Kobori, N.N., et al. (2015) **Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and bioefficacy of blastospores**. Applied Microbiology and Biotechnology, 99, 6653–6665. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6620-3>
- Mascarin, G.M., Jaronski, S.T. (2016). **The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32.
- Mascarin, G.M., Lopes, R.B., Delalibera Junior, I, et al (2019) **Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil**. Journal of Invertebrate Pathology, 165, 46–53.
- Massart, S., Margarita, M.M., Jijakli, M.H. (2015) **Biological control in the microbiome era: Challenges and opportunities**. Biological Control, 89, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.06.003>
- Michereff Filho, M., Faria, M., Wraight, S., et al. (2009). **MicoInseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas?** Instituto Biológico, 76(4), 769-779.
- Miranda, R. A. de. (2020). **Breve história da agropecuária brasileira**. In Landau, Charlotte, E., et al. *Dinâmica da Produção Agropecuária e da Paisagem Natural no Brasil nas Últimas Décadas: dinâmica da produção agropecuária e da paisagem natural no Brasil nas últimas décadas*. Embrapa, 2, 31-57.
- Moral, R.A., Hinde, J., Demétrio, C.G.B. (2017). **“Half-Normal Plots and Overdispersed Models in R: The hnp Package.”** _Journal of Statistical Software_, *81*(10), 1-23. <https://doi.org/10.18637/jss.v081.i10>

- Moscardi, F., et al. (2012). **Artrópodes que atacam folhas da soja**. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B., et al. *Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*. Embrapa, 4, 213-333
- Müller, D.B., Vogel, C., Bai, Y., Vorholt, J.A. (2016). **The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives**. *Annual Review of Genetics*, 50, 211–234.
- Pal, K.K., Gardener, B.M. (2006). **Biological Control of Plant Pathogens**. The Plant Health Instructor. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>
- Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., et al. (2014) **Induced systemic resistance by beneficial microbes**. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Posada, F., Vega, F.E. (2006) **Inoculation and colonization of coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales)**. *Mycoscience*, 47, 284–289. <https://doi.org/10.1007/s10267-006-0308-6>
- Quesada-Moraga, E., Landa, B. B., Muñoz-Ledesma, J., Jiménez-Díaz, R. M., Santiago-Álvarez, C. (2006). **Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain**. *Mycopathologia*, 161(5), 323–329. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0014-0>
- Quintero-Cerón, Pablo, J., Bohorquez-Pérez, Y., Valenzuela-Real, C., Solanilla-Duque, J.F. (2013). **Avances en la aplicación de luz ultravioleta de onda corta (UVC) en frutas y vegetales enteros y mínimamente procesados**. *Tumbaga* 1(8), 29-60.
- R Core Team (2022). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>
- Redford, A.J., Bowers, R.M., Knight, R., et al. (2010) **The ecology of the phyllosphere: Geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves**. *Environmental Microbiology*, 12, 2885–2893. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02258.x>
- Rehner, S.A., Minnis, A.M., Sung, G.H., et al. (2011) **Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria***. *Mycologia*, 103, 1055–1073. <https://doi.org/10.3852/10-302>
- Russo, M. L., Pelizza, S. A., Vianna, M. F., Allegrucci, N., Cabello, M. N., Toledo, A. V., Mourellos, C., Scorsetti, A. C. (2018). **Effect of endophytic entomopathogenic fungi**

on soybean *Glycine max* (L.) Merr. growth and yield. Journal of King Saud University - Science, 31(4), 728–736. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.04.008>

Schulz B, Boyle C. (2005). **The endophytic continuum.** Mycological Research, 109(6), 661-86. [doi: 10.1017/s095375620500273x](https://doi.org/10.1017/s095375620500273x). PMID: 16080390

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

Stevens, C., Khan, V. A., Lu, J. Y., Wilson, C. L., Pusey, P. L., Igwegbe, E. C. K., Kabwe, K., Mafolo, Y., Liu, J., Chalutz, E., & Droby, S. (1997). **Integration of Ultraviolet (UV-C) Light with Yeast Treatment for Control of Postharvest Storage Rots of Fruits and Vegetables.** Biological Control, 10(2), 98-103. <https://doi.org/10.1006/bcon.1997.0551>

Stone, B.W.G., Weingarten, E.A., Jackson, C.R. (2018) **The role of the phyllosphere microbiome in plant health and function.** Annual Plant Reviews Online, 1, 533–556. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0614>

Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P (2008). **Simultaneous Inference in General Parametric Models.** Biometrical Journal, 50(3), 346-363.

Vidal, S., Jaber, L. R. (2015). **Entomopathogenic fungi as endophytes: plant-endophyte-herbivore interactions and prospects for use in biological control.** Current Science, 109(1).

Vorholt, J.A. (2012) **Microbial life in the phyllosphere.** Nature Reviews Microbiology, 10, 828–840.

Wagner, B.L., Lewis, L.C. (2000). **Colonization of Corn, *Zea mays*, by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*.** Appl Environ Microbiol, 66(8), 3468–3473. [doi: 10.1128/aem.66.8.3468-3473.2000](https://doi.org/10.1128/aem.66.8.3468-3473.2000)

Whipps, J.M., Hand, P., Pink, D., Bending, G.D. (2008) **Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype.** Journal of Applied Microbiology, 105, 1744-1755.

Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J. (1998) **Perspective Prokaryotes: The unseen majority.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(12), 6578-6583.

Xu, Y., Charles, M. T., Luo, Z., Mimee, B., Tong, Z., Véronneau, P. Y., Roussel, D., & Rolland, D. (2019). **Ultraviolet-C priming of strawberry leaves against subsequent**

Mycosphaerella fragariae infection involves the action of reactive oxygen species, plant hormones, and terpenes. *Plant Cell and Environment*, 42(3), 815–831.
<https://doi.org/10.1111/pce.13491>