



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUÍZA MARIA PERES SIMAS BORGES

**INFLUÊNCIA DA ENDOFITIA POR FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO NO
DESENVOLVIMENTO E TOLERÂNCIA DA PLANTA AO ESTRESSE HÍDRICO E NA
SOBREVIVÊNCIA DE AFÍDEOS**

São João del-Rei – MG

Dezembro de 2023

LUÍZA MARIA PERES SIMAS BORGES

**INFLUÊNCIA DA ENDOFITIA POR FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO NO
DESENVOLVIMENTO E TOLERÂNCIA DA PLANTA AO ESTRESSE HÍDRICO E NA
SOBREVIVÊNCIA DE AFÍDEOS**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Curso Biotecnologia da Universidade Federal de São João del Rei, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Wellington Garcia de Campos.

Coorientadora: Dra. Michelle O. C. de Mendonça.

São João del-Rei – MG

Dezembro de 2023

Agradecimentos

Ao professor Wellington Garcia Campos e á doutoranda Michelle Oliveira, que me orientaram e ensinaram tanto, sempre dando todo auxílio para minha formação acadêmica.

Ao Departamento de Engenharia de Biotecnologia (DBTEC) e ao Curso de Biotecnologia por todos os recursos e equipamentos necessários para realização desse projeto.

A todos que me ajudaram durante esse processo, fossem colegas, professores, funcionários dentro e fora da UFSJ. Um agradecimento especial aos meus amigos Lilian, Arthur, Raphael, Yasmin que foram muito importantes nesse momento, dando todo suporte emocional necessário. Mas em maior destaque à meu alicerce nesse caminho todo, que partilhou e dividiu comigo os momentos bons e ruins, à você Bruna.

A República Dona Bolha, que me deu muito mais que um lar nessa trajetória. É sempre bom ter um lugar para voltar. Foram momentos, amizades e aprendizados que não podem ser mensurados.

A minha mãe, que foi a chave para que eu esteja concluindo esse projeto. Sem você, nada disso seria possível. Agradeço pelos momentos de desabafo, de quando eu quis desistir e você esteve ali sempre para me moldar e ajustar no caminho certo. Obrigada sempre por todo apoio.

Aos meus irmãos, que foram minha inspiração em todo o processo.

A CNPq e a UFSJ pela oportunidade e concessão da bolsa de Iniciação Científica.

RESUMO

Fungos endofíticos podem estabelecer uma relação mutualística com as plantas, tornando-as mais tolerantes a estresses bióticos e abióticos. Neste estudo, investigamos a capacidade do novo fungo entomopatogênico *Metarhizium sp.* (UFMG 11444), por meio da endofitia, melhorar o desenvolvimento de plantas de couve (*Brassica oleraceae var. acephala*) e controlar a população de afídeos *Brevicoryne brassicae*, uma das principais pragas em culturas de brássicas. O fungo foi encontrado e isolado de insetos infectados na natureza e inoculado nas sementes de couve, que foram submetidas a condições adequadas de irrigação (controle) e de estresse hídrico. O *Metarhizium sp.* apresentou comportamento endofítico e melhorou significativamente o desenvolvimento das plantas, especialmente sob estresse hídrico. Além disso, o fungo *Metarhizium sp.* exerceu um efeito restritivo sobre o crescimento populacional dos afídeos. Este estudo indica o potencial da prospecção de novos fungos entomopatogênicos endofíticos para melhorar a tolerância e a produtividade de plantas em condições de estresse hídrico, bem como para o controle biológico de pragas. A técnica de inoculação endofítica pode ser uma abordagem mais eficiente e sustentável para o manejo integrado de pragas e a mitigação de estresses abióticos de plantas agrícolas.

Palavras-chave: Controle biológico. Controle microbiano. Estresse abiótico. Interação planta-inseto-fungo.

ABSTRACT

Endophytic fungi can establish a mutualistic relationship with plants, making them more tolerant to biotic and abiotic stresses. In this study, we investigated the ability of the new entomopathogenic fungus *Metarhizium sp.* (UFMG 11444), through endophytosis, to improve the development of cabbage plants (*Brassica oleraceae var. acephala*) and control the population of aphids *Brevicoryne brassicae*, one of the main pests in brassica crops. The fungus was found and isolated from infected insects in the wild and inoculated into cabbage seeds, which were subjected to suitable irrigation conditions (control) and water stress. *Metarhizium sp.* showed endophytic behavior and significantly improved plant development, especially under water stress. In addition, the fungus *Metarhizium sp.* exerted a restrictive effect on aphid population growth. This study indicates the potential of prospecting for new endophytic entomopathogenic fungi to improve the tolerance and productivity of plants under conditions of water stress, as well as for the biological control of pests. The endophytic inoculation technique may be a more efficient and sustainable approach to integrated pest management and the mitigation of abiotic stresses in agricultural plants.

Keywords: Biological control. Microbial control. Abiotic stress. Plant-insect-fungus interaction.

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	7
2.	OBJETIVOS	10
2.1	Objetivo geral:	10
2.2	Objetivos específicos:	11
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.3	Inoculação do fungo e submissão da planta ao estresse hídrico	13
3.4	Inserção e avaliação do inseto herbívoro	14
3.5	Análise de desempenho da planta	14
3.6	Análise estatística	15
4.	RESULTADOS	15
5.	DISCUSSÃO	17
6.	CONCLUSÃO	19
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

1. INTRODUÇÃO

A busca por alternativas de controle de pragas de forma natural tem sido ampliada cada vez mais com o objetivo de reduzir o uso de pesticidas químicos na agricultura e minimizar suas consequências negativas (Lacey et al., 2017). A aplicação generalizada e excessiva de pesticidas contendo o mesmo grupo de ingredientes ativos conduz ao desenvolvimento de resistências, levando a um produto menos ou nada eficaz (Zhan et al., 2014). Além disso, o uso de defensivos químicos também afeta o meio ambiente e prejudica organismos não-alvos, esses que são essenciais para a produção de alimentos (Kumar e Kumar, 2019; Islã et al., 2017). O uso de pesticidas pode contaminar reservatórios de água, rios, recursos hídricos e bacias fluviais, podendo afetar a flora aquática, os peixes e protozoários, alterando a reprodução e crescimento dos organismos vivos aquáticos (Mansano et al., 2016). Ademais, esses pesticidas químicos apresentam consequências não só na contaminação do meio ambiente como também para a intoxicação dos agricultores e consumidores (Celoto et al., 2008).

Dessa forma, uma vasta literatura sobre o uso de fungos entomopatogênicos têm mostrado que esses agentes podem realizar o controle biológico de insetos-praga como alternativa aos pesticidas (Shah & Pell, 2003; Hussain et al., 2014; Lacey et al., 2015; Brunner-Mendoza et al., 2018). Isso porque eles ocorrem naturalmente e apresentam uma alta especificidade e afetam pouco ou não afetam negativamente os organismos não-alvos. Também são economicamente acessíveis, e podem se replicar dentro do hospedeiro alvo, produzindo esporos virulentos, sendo assim de fácil produção. Em geral, não trazem danos ao usuário ou ao consumidor (Hussain et al., 2009, Hussain et al., 2014).

Existem diversas espécies com várias linhagens comerciais de fungos entomopatogênicos, facilmente acessíveis ao agricultor para uso em diversas culturas e pragas (Updhyay, 2003; Zimmermann et al., 2007; Lacey et al., 2015). No entanto, o método usual de aplicação dos fungos entomopatogênicos por aspersão, sobre as plantas infestadas, tal qual os inseticidas químicos sintéticos, pode apresentar algumas limitações. A eficiência desses agentes no controle biológico pode ser diminuída, no campo, por fatores abióticos como temperatura,

radiação UV e baixa umidade. Também depende da localização e exposição do hospedeiro na planta, visto que insetos podem se alojar por baixo e dentro de folhas, nas raízes ou outras partes que escapam aos fungos (Greenfield et al., 2016). Há também problemas com a calibração das dosagens corretas, duração do efeito desejado e dúvidas sobre potenciais consequências sobre insetos não-alvos (Lacey et al. 2015).

Há relatos recentes mostrando que alguns fungos entomopatogênicos também podem apresentar uma relação endofítica com as plantas (Greenfield et al., 2016; Jaber et al., 2018). Os microorganismos endofíticos vivem no interior de plantas e habitam seus órgãos sem causar nenhum dano à planta hospedeira, sendo muito comum na natureza. Cada espécie de planta pode abrigar centenas de fungos e bactérias endofíticas e essa interação ocorre com praticamente todas as espécies de plantas terrestres, ao longo de milhões de anos de evolução (Hardoim et al. 2015; Ferreira et al., 2017, Omomowo e Babalola, 2019).

Fungos entomopatogênicos podem ter se adaptado para adquirir nutrientes e proteção dentro de tecidos vegetais (Humbler, 2008), mas eles também podem ter tido sua origem evolutiva como organismos endofíticos, que passaram a parasitar insetos como uma fonte adicional rica em nitrogênio (Barelli et al., 2016; Felber et al., 2013). Plantas também podem ter alterado a história de vida de fungos para aumentar sua sobrevivência, desenvolvimento e sucesso reprodutivo (Elliott et al, 2000).

A presença endofítica de fungos entomopatogênicos, inclusive pela inoculação artificial de linhagens comerciais, visivelmente não prejudica a aparência das plantas, mas elas se desenvolvem melhor e ainda tem aumentada a sua resistência ou tolerância contra microorganismos patogênicos, insetos herbívoros e outras condições ambientais adversas (Felber et al., 2013, Jaber et al., 2018; González-guzmán et al., 2020). Desse modo, a endofítia por fungos entomopatogênicos beneficia a planta por meio de mecanismos diversos que extrapolam a ação direta de mortalidade dos insetos herbívoros. No entanto, ainda está em estágio primário o conhecimento sobre esses mecanismos e os seus efeitos indiretos sobre os insetos. Esta proposta de estudo tenta avançar nesse sentido.

Além do ataque por patógenos e insetos, plantas estão sob constante pressão de fatores abióticos e situações extremas de estresse, as quais podem levá-las à interrupção do desenvolvimento, queda de produção ou até mesmo à morte. No estresse hídrico, em particular, a planta aloca energia e maximiza mecanismos de economia e tolerância à falta de água, enquanto tem seu desenvolvimento reduzido. Esse estresse é percebido primeiro na redução das taxas de fotossíntese e do crescimento, mas decorrem de uma série complexa de alterações em níveis estrutural, bioquímico, molecular e fisiológico (Texeira et al., 2019).

Recentemente, estudos revelam que a inoculação endofítica de fungos entomopatogênicos pode promover o crescimento e a melhoria de condições estruturais e fisiológicas da planta, como o comprimento da raiz, ganho de biomassa, área foliar, germinação de sementes, altura da planta e estado nutricional (Russo et al., 2019). Dessa forma, o presente estudo questiona se a relação endófito-hospedeiro poderia melhorar a tolerância da planta ao estresse hídrico e, por consequência, o seu desenvolvimento vegetativo.

Há renovadas perspectivas biotecnológicas para o uso de fungos no controle biológico de pragas, como é o caso do *Beauveria bassiana* encontrado no milho (Pelizza et. al, 2017; Vega, 2017) e do *Trichoderma spp* (Poveda, 2021), que protegem várias culturas contra insetos. Também foi demonstrado o comportamento endofítico e virulento do novo fungo entomopatogênico *Merthazium sp* UFMG 11444 que inviabilizou mais de 90% dos ovos e mortalidade de ovos e das ninfas das cigarrinhas *Mahanarva spectabilis* (Campagnani et al., 2017).

Dessa forma, ao invés da aspersão superficial do produto nas lavouras, uma estratégia inovadora em perspectiva é a inoculação e estabilização do fungo no interior da planta, como um agente preventivo endofítico que não causa prejuízos à planta (Krell et al., 2018). A inoculação endofítica do entomopatógeno tem potencial para superar problemas decorrentes da aplicação inundativa do fungo, mas também para aumentar a tolerância da planta aos estresses bióticos e abióticos e, por consequência, melhorar seu desenvolvimento e produtividade.

Os pulgões são insetos (Hemiptera: *Aphididae*) que se alimentam sugando os nutrientes e água do sistema vascular das plantas por meio da perfuração do tecido

com suas partes bucais (Ahuja et al 2010). Os afídeos possuem tamanho reduzido, alta capacidade de reprodução e se instalam em uma cultura provocando danos diretos e indiretos à planta hospedeira por meio da sucção contínua da seiva, injeção de toxinas e transmissão de patógenos (Sidney, 2009 e Rando et al 2011). Dessa forma, esses insetos causam problemas como murcha generalizada, encarquilhamento das folhas e interrupção do desenvolvimento da planta (Rando et al., 2011; Ahuja et al., 2010). Os produtos químicos sintéticos são os mais utilizados para controle dessas pragas, entretanto, trazem consequências sérias como a seleção de pulgões mais resistentes e o impacto negativo em outros organismos-não alvos (Botti et al 2015).

O modelo de estudo consistiu de plantas do gênero *Brassica* e seus insetos associados, sendo os pulgões (*Brevicoryne brassicae*) uma de suas principais pragas (Sarfraz et al., 2006). As brássicas possuem múltiplos mecanismos de defesa contra insetos e patógenos, tendo os glucosinolatos tóxicos como sua principal linha de defesa química. Entretanto, alguns organismos especialistas conseguem superar essa barreira de defesa (Ahuja et al., 2010) Como as brássicas são geralmente consumidas frescas, é recomendado o uso de métodos de controle de pragas por meios alternativos aos pesticidas tóxicos. O novo fungo entomopatogênico *Merthazium sp.* (registrado no banco de fungos da UFMG sob código 11444), recentemente prospectado, já mostrou comportamento endofítico, por meio da inoculação artificial (Campagnani et al., 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

O presente projeto teve como objetivo avaliar se a inoculação endofítica do fungo entomopatogênico *Merthazium sp.* UFMG 11444 beneficia as plantas de couve-comum *Brassica oleracea var. acephala*.

2.2 Objetivos específicos:

Avaliar se a inoculação endofítica:

- a) melhora o desenvolvimento vegetativo e a produção de biomassa da planta;
- b) aumenta a resistência da planta a pulgões-de-couve (*Brevicoryne brassicae*), por afetar o desenvolvimento e a sobrevivência do inseto;
- c) melhora a tolerância da planta ao estresse hídrico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

Para realização do experimento, as plantas de couve foram cultivadas em vasos de plástico de 10 litros em casa-de-vegetação (9 m x 25 m), cobertas com plástico transparente à prova d'água e revestidas lateralmente com rede anti-afídeos. A casa-de-vegetação está localizada no Campus Tancredo Neves (CTAN) da UFSJ. No processamento e análise das amostras obtidas no experimento, utilizou-se o Laboratório de Ecologia de Aplicada e Biodiversidade (LEABI) do Departamento de Engenharia de Biosistemas, no Campus Dom Bosco da UFSJ.

3.2 Delineamento e instalação do experimento

O delineamento foi inteiro casualizado (DIC), realizado com quatro tratamentos bifatoriais: A) Planta sem estresse hídrico e sem inoculação de fungo *Metarhizium sp.*; B) Planta sem estresse hídrico e com inoculação endofítica do fungo; C) Planta sob estresse hídrico e sem inoculação; D) Planta sob estresse hídrico e com inoculação do fungo.

Cada um dos quatro tratamentos possuía 30 plantas, sendo uma por vaso, totalizando assim 120 plantas. Os grupos de plantas A, B, C e D foram divididas pela metade, em dois experimentos. Assim, cada tratamento de cada experimento possuía 15 repetições. Um experimento foi utilizado para medição de características de desenvolvimento da planta e, no outro experimento, as plantas receberam infestação artificial com pulgões *B. brassicae*, para avaliação da resposta populacional do inseto (Figuras 1 e 2).

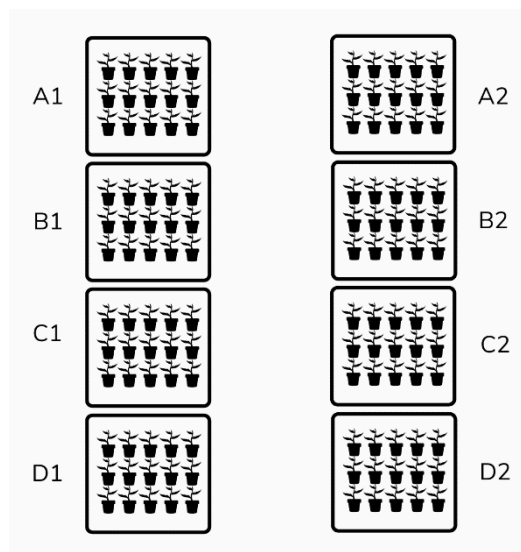


Figura 1: Esquema de distribuição dos tratamentos em vasos de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*.) sob as bancadas em casa-de-vegetação, em dois experimentos (1 e 2). Os tratamentos foram: A1 e 2) Planta sem estresse hídrico e sem inoculação do fungo; B1 e 2) Planta sem estresse hídrico e com inoculação endofítica do fungo; C1 e 2) Planta sob estresse hídrico e sem inoculação; D1 e 2) Planta sob estresse hídrico e com inoculação do fungo.



Figura 2. A) Plantas sem inoculação e sem estresse hídrico. B) Plantas sem inoculação e com estresse hídrico. C) Plantas com inoculação e sem estresse hídrico. D) Plantas com inoculação e com estresse hídrico.

3.3 Inoculação do fungo e submissão da planta ao estresse hídrico

A inoculação endofítica de fungos entomopatogênicos via sementes tem se mostrado viável (Parsa et al. 2018). Foram preparadas suspensões de conídios de uma linhagem de *Merthazium sp.* (UFMG 11444). O fungo foi cultivado em ágar batata dextrose (BDA) e incubado a 25°C no escuro. Após 15 dias, os conídios foram colhidos por raspagem da placa de Petri e transferidos para 10mL contendo 0,01% (v/v) de Tween 80 (polioxietilenosorbitano). A suspensão foi filtrada e homogeneizada por agitação durante 10 minutos. Usando uma câmara Neubauer, a concentração da suspensão foi ajustada em 1×10^8 conídios/mL.

Após esse procedimento, sementes de couve foram imersas na suspensão de conídios. As sementes controle foram imersas em solução livre de conídios composta por Tween 80 a 0,01%. Em seguida, as sementes secaram em papel estéril em cabine de fluxo laminar por 30 minutos. Esse procedimento deixou as sementes prontas para serem semeadas nos vasos, os quais foram preenchidos com solo de barranco com a fertilidade corrigida (Valim et al., 2016).

Os vasos foram mantidos na casa de vegetação sob temperatura ambiente e irrigados a cada 48h com 1000mL de água para cada muda até que atingirem 25 dias de germinação. Conforme o delineamento definido anteriormente, após esse período, um grupo de plantas (vasos) continuou recebendo irrigação de 1000 ml de água a cada 48 h, enquanto o outro grupo recebeu o tratamento de estresse hídrico severo de 170 ml de água a cada 48h (Valim et al. 2016). As plantas foram então submetidas aos seus respectivos tratamentos por 25 dias, quando as variáveis foram mensuradas.

Para verificar a capacidade do *Merthazium sp.* de colonizar internamente a planta, foram coletadas amostras de folhas dos quatro tratamentos. A superfície das amostras coletadas foi esterilizada com hipoclorito de sódio a 2% por 3 min, seguido de enxágue triplo com água destilada estéril, antes de deixá-las secar assepticamente

em fluxo laminar. As amostras foram então cortadas em pequenos pedaços (4 cm x 4 cm) e colocadas de forma estéril em meio de cultura seletiva de ágar batata dextrose (BDA). As placas de Petri mantidas lacradas por 10 dias em incubadora a 20°C e 14h de fotoperíodo. O isolamento e identificação do fungo crescido nas placas foi feito após os 10 dias de incubação, utilizando-se de características morfológicas da cultura. Entre outras, o *Merthazium sp.* pode ser identificado como uma crosta conidial amarelada na superfície média da placa, conforme figura 1. O conjunto de testes de reisolamento foi replicado três vezes (3 placas) para cada amostra.

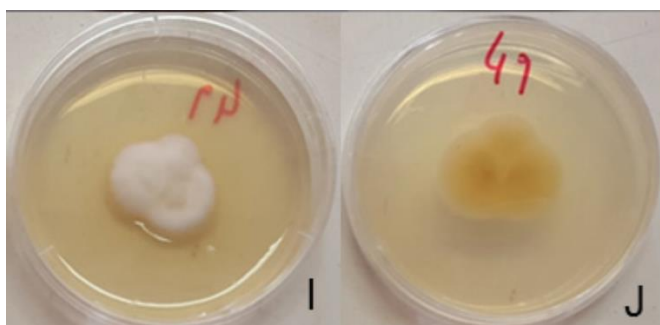


Figura 1: Foto de uma placa de petri com o fungo *Merthazium sp.* (UFMG 11444) isolado. Fonte: CAMPAGNANI et al. Propection and Fungal Virulence Associated with *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) in an Amazon Silvopastoral System, 100(2):426-432. 2017

3.4 Inserção e avaliação do inseto herbívoro

Foram utilizados pulgões-da-couve, os quais foram obtidos de um cultivo comercial próximo a São João Del Rei. Dez pulgões foram inseridos na extremidade superior de cada planta dos quatro tratamentos. Ao final de 15 dias, foi feita a contagem dos afídeos em cada vaso para avaliação do crescimento populacional do inseto.

3.5 Análise de desempenho da planta

Foram mensuradas o comprimento, largura, quantidade de folhas, biomassa total e a altura da planta. O comprimento da folha foi calculado como a média da terceira à quinta folha no estrato médio. Parte aérea foi secada em estufa até a estabilização do peso, para obtenção da biomassa.

3.6 Análise estatística

Para análise de normalidade foi usado o teste de Kolmogorov-Smirnov e para homogeneidade de variância foi pelo teste de Bartlett. Para análises paramétricas das respostas diretas do vegetal e indiretas de *Brevicoryne brassicae* em relação ao fungo e ao estresse hídrico, os dados foram submetidos à ANOVA fatorial seguida pelo teste HSD de Tukey. Também foi utilizado análises não-paramétricas de Kruskal-Wallis seguidas pelo teste HSD de Dunn. Todas as análises ao nível $\alpha < 0,05$.

4. RESULTADOS

O fungo *Metarhizium sp.* mostrou-se eficiente em promover o desenvolvimento das plantas em condições adequadas de irrigação (sem estresse hídrico), visto que o peso seco das plantas (biomassa), comprimento das folhas e largura das folhas de plantas inoculadas foram maiores em comparação com as plantas do controle, sem inoculação do fungo (Figura 3 A, B, C). No entanto, não foram identificadas diferenças no número de folhas e na altura das plantas em condições sem estresse hídrico (Figura 3 D, E).

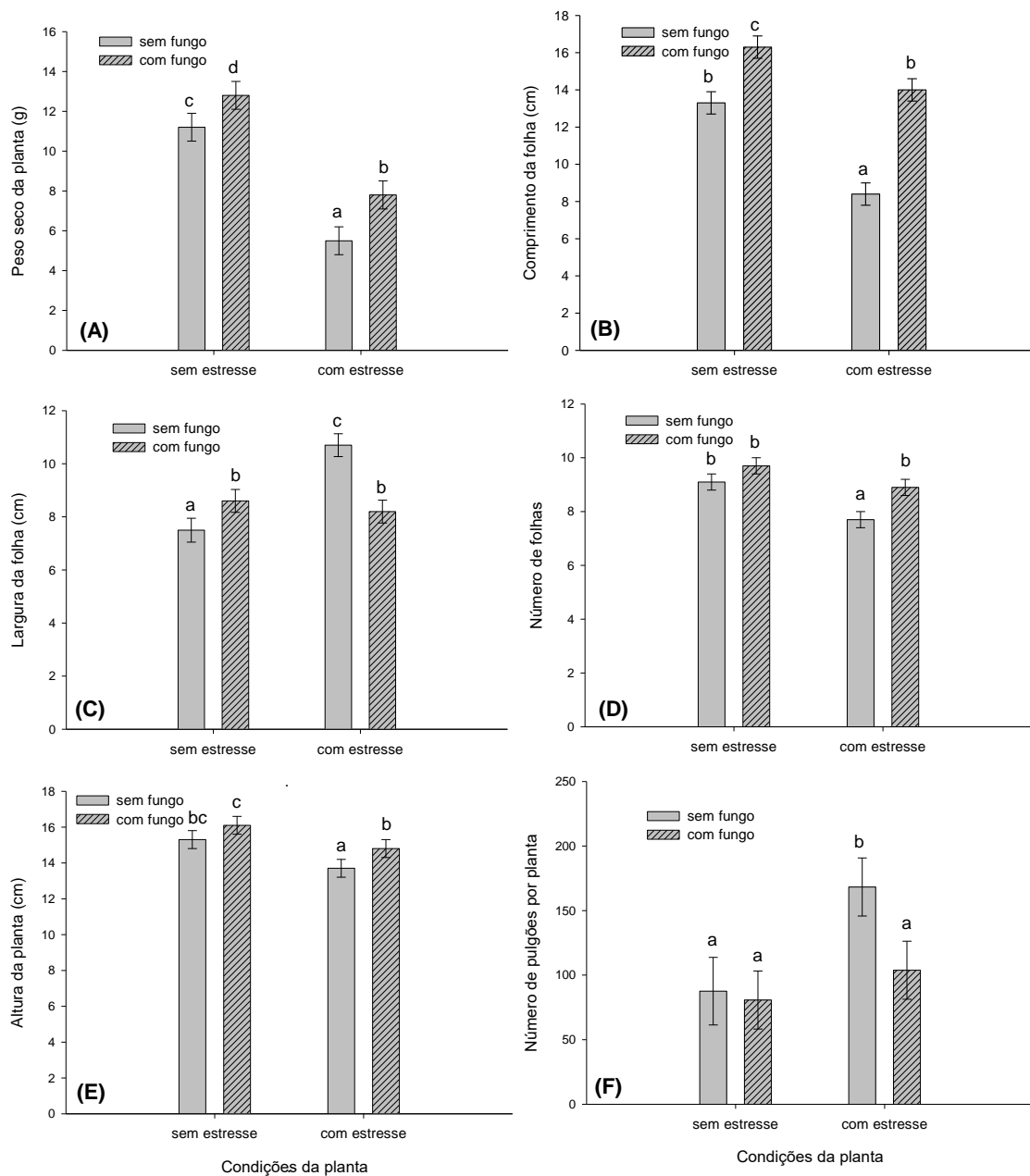


Figura 3: Características relacionadas ao desenvolvimento da couve *Brassica oleracea var. acephala*. (A-E) em condições adequadas de irrigação e sob estresse hídrico, inoculadas ou não com o fungo entomopatogênico *Metarhizium sp* ainda na fase de sementes, assim como a resposta indireta (crescimento populacional em 15 dias) de afídeos *Brevicoryne brassicae* em plantas submetidas às mesmas condições de regime hídrico e inoculação com fungo (F).

Por outro lado, quando foi aplicada uma segunda variável à planta, ou seja, quando submetida ao estresse hídrico, a inoculação do fungo melhorou não somente o peso seco das plantas (biomassa) e o comprimento das folhas, mas também o número de folhas e a altura das plantas (Figura 3 A, B, D, E). Portanto, a inoculação do fungo apresentou efeitos benéficos ainda mais abrangentes sobre a planta quando ela estava sob condição de estresse hídrico, embora o resultado específico sobre a largura das folhas foi inconsistente com essa hipótese (Figura 3 C). De qualquer modo, de um modo geral, ficou evidente que o estresse hídrico reduziu o desenvolvimento da planta, registrado em várias de suas características, entretanto, a inoculação do fungo, ainda na fase de sementes, minimizou significativamente os efeitos negativos da seca sobre o desenvolvimento da planta (Figura 3 A, B, D, E).

Não foi encontrada diferença significativa no crescimento populacional dos pulgões-da-couve em plantas sem estresse hídrico submetidas ou não à inoculação do fungo entomopatogênico (Figura 3 F). Por outro lado, em plantas sob estresse hídrico, a densidade populacional do inseto aumentou mais, em um prazo de 15 dias, em plantas que não receberam a inoculação do fungo. Os resultados mostraram um efeito indireto expressivo do fungo, sobre os insetos, em plantas sob estresse hídrico.

5. DISCUSSÃO

Um fator de estresse severo para as plantas é a falta de água, pois elas direcionam sua energia para a aclimatização, com um decréscimo de fotossíntese e produtividade e diminuição de funções vitais como reprodução, crescimento e defesa (Valim et al., 2016). Entretanto, a inoculação endofítica de fungos entomopatogênicos, como promotora de melhorias estruturais e fisiológicas da planta, como aumento do comprimento da raiz, ganho de biomassa, área foliar e altura da planta (Russo et al., 2019) poderia auxiliar na tolerância das plantas à seca. Nesse sentido, o presente trabalho trouxe evidência para essa hipótese, utilizando-se um novo fungo entomopatogênico do gênero *Metarhizium*. Existem muitas outras espécies e linhagens de fungos entomopatogênicos, incluindo tipos tradicionalmente comercializados para o controle biológico de insetos pragas (Lacey et al., 2015; Updhyay, 2003; Zimmermann et al., 2007). A possibilidade de realizar a inoculação

endofítica de alguns desses agentes pode trazer um avanço biotecnológico importante para a produção vegetal, por melhorar o desempenho das plantas diante variados tipos de estresses abióticos.

Fungos entomopatogênicos têm representado uma opção viável para o controle biológico sem causar malefícios à planta (Chandler., 2016). Em conjunto, não apresentam um risco considerável para outros organismos que estão no ambiente tratado (Lacey et al., 2015). Entretanto, fatores como radiação solar, umidade e temperatura podem ser restritivos para esses biopesticidas, quando aplicados pelo método tradicional de pulverização da lavoura (Brunner-Mendoza et al., 2018). Como alternativa, o uso da inoculação endofítica têm se mostrado promissora para contornar essas condições abióticas (Wani et al., 2015). Além disso, a endofítia exerce um efeito negativo, às vezes sub-letal, sobre outros microrganismos que são fitopatogênicos e sobre insetos herbívoros, promovendo, no conjunto, um efeito positivo no desenvolvimento da planta (Gond et al., 2010; Kabaluk & Ericsson, 2007; Russo et al., 2019). Mesmo na ausência dos insetos herbívoros, parece ter ocorrido uma relação mutualística entre *Metarhizium sp.* e a planta, que apresentou um melhor desenvolvimento. Além disso, quando os pulgões foram inseridos no sistema, seu crescimento populacional foi negativamente afetado em plantas sob estresse hídrico e inoculadas com fungo.

Prince e Chandler (2020), com o objetivo de diminuir a densidade populacional dos afídeos *Myzus persicae*, *Brevicoryne brassicae* e *Nasonovia ribisnigris*, utilizando o fungo *Beauveria bassiana*, obtiveram 86% de redução das ninfas. Em campo, pelo método tradicional de pulverização do fungo, ocorreu uma redução específica de 73% dos pulgões-de-couve *B. brassicae*, aplicando-o duas vezes com intervalo de 7 dias. No presente estudo obteve-se uma redução significativa no crescimento populacional de *B. brassicae* com apenas uma inoculação endofítica, por meio das sementes, do fungo *Metarhizium sp.* em casa de vegetação.

Kim (2007) avaliou o efeito do fungo entomopatogênico *Lecanicillium arrenuatum* no desenvolvimento e reprodução do afídeo *Aphis gossypii*. Foi observado que a expectativa de vida e a taxa total de fecundidade foram reduzidas quando expostos ao fungo. Gurulingappa *et al.* (2010) mostraram também que os fungos *Beauveria*

bassiana e *Lecanicillium lecanii* foram capazes de retardar a reprodução do afídeo *A. gossypii*, contudo, não causaram mortalidade direta. O crescimento populacional desses insetos está diretamente relacionado ao seu tempo de desenvolvimento e à taxa de reprodução (Perng, 2002). No presente trabalho, a densidade populacional dos pulgões nas plantas estressadas e inoculadas com *Metarhizium sp* cresceu significativamente menos que em plantas não inoculadas, contudo, não avaliamos os mecanismos. É preciso realizar mais estudos para avaliar se a causa está na mortalidade diretamente causada pelo fungo ou se há indução de mecanismos químicos de defesa na planta, causando redução nas taxas de reprodução e desenvolvimento ou ainda repelência dos insetos. De todo modo, a nova técnica da inoculação endofítica de fungos entomopatogênicos pode ser indicada como mais vantajosa do que a pulverização tradicional do agente sobre as plantas.

6. CONCLUSÃO

O fungo *Metarhizium sp* demonstrou comportamento endofítico e capacidade de melhorar o desenvolvimento das plantas de couve, principalmente quando submetidas a uma condição severa de estresse hídrico. Especialmente nessa condição, o fungo inoculado também exerceu um efeito restritivo sobre o crescimento populacional de afídeos *B. brassicae*, uma das principais pragas nas culturas de brássicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHUJA, I., Rohloff, J., & Bones, A. M. (2010). Defense mechanisms of Brassicaceae: Implications for plant-insect interactions and potential for integrated pest management. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30: 311-348.
- BATTA, Y. A. (2013). Efficacy of endophytic and applied *Metarhiziumanisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against larvae of *Plutellaxylostella* L. (Yponomeutidae:Lepidoptera) infesting *Brassica napus* plants. *Crop Protection* 44: 128-134.
- BRUNNER-MENDOZA, C.; REYES-MONTES, M. del R.; MOONJELY, S.; BIDOCHKA, M. J; TORIELLO, C.. A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. *Biocontrol Science And Technology*, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 83-102, 5 out. 2018.
- BOTTI, J. M. C.; HOLTZ, A. M.; PAULO, H. H.; FRANZIN, M. L.; PRATISSOLI, D.; PIRES, A. A. Controle alternativo do *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae) com extratos de diferentes espécies de plantas. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 10, n. 2, p.178-183, 2015.
- CAMPAGNANI, M. O., W. G. Campos, S. S. Amorim, L. H. Rosa, A. M. Auad, M. A. Cangussú and R. M. Maurício. Prospection and Fungal Virulence Associated with *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) in an Amazon Silvopastoral System, 100(2):426-432. 2017.
- CHANDLER, D. Basic and applied research on entomopathogenic fungi. In *Microbial Agents of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice*; Lacey, L., Ed.; Academic Press: London, UK, 2016; pp. 42–60.
- CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 30, n. 1, p. 1-5, 2008

- ELLIOT, S.L., Sabelis, M.W., Janssen, A., van der Geest, L.P.S., Berling, E.A.M., Fransem, J. (2000). Canplants use entomopathogens as bodyguards? *EcologyLetters*, 3: 228-235.
- ENRIQUE QUESADA-MORAGA, J. A. Navas-Cortés, E. A.A. Maranhao, A. Ortiz-Urquiza, C. Santiago-Álvarez. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research*, Volume 111, p. 947-966, agosto, 2007.
- FERREIRA, M. C., Cantrel, C. L., Wedge, D. E. Gonçalves, V. N. Jacob, M. R., Khan, S., Rosa, C. A., Rosa, L. H. (2017). Diversity of the endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical planta *Vellozia gigante* an from the endangered Brazilian rupestrian grassland. *Biochemical Systematics and Ecology*, 71: 163-169.
- GOND, S.K., Verma, V.C., Mishra, A., Kumar, A., Kharwar, R.N., 2010. Role of fungal endophytes in plant protection. In: Arya, A., Perelló, A.E. (Eds.), *Management of Fungal Plant Pathogens*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 183–197.
- GONZALEZ-GUZMAN, A., Sacristán, D., Quesada-Moraga, E., Torrent, J., del Campillo, M.C., Sánchez-Rodríguez, A. R. (2020). Effects of entomopathogenic fungi on growth and nutrition in wheat grown on two calcareous soils: Influence of the fungus application method. *Annals of Applied biology*, 177: 26-40.
- GREENFIELD, M., Gómez-Jiménez, M., Ortiz, V., Vega, F. E., Kramer, M., Parsa, S. (2016). *Beauveria bassiana* and *Metarhiziumanisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation, *Biological Control*, 95: 40-48.
- GURULINGAPPA, P.; Sword, G. A.; Murdoch, G.; McGee, P. A. 2010. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. *Biological Control*, 55: 34-41.
- HARDOIM, P.R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M, Compant, S., Campisano, A., Döring, M. Sessitsch, A (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79: 293-320.

- HUMBER, R.A. (2008). Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98: 262-266.
- HUSSAIN, A.; TIAN, M.Y.; AHMED, S. Entomopathogenic fungi disturbed the larval growth and feeding performance of *Ocinara varians* (Lepidoptera:Bombycidae) larvae. *Insect Science*, p. 511-517, nov. 2009
- HUSSAIN, A., Haq, M.R., Al-Ayedh, H., Al-Jabr, A.M. 2014 Mycoinsecticides: Potential and future perspective. *Recent Patents in Food, Nutrition & Agriculture*, 6: 45-53.
- Islam, Md.N., Bint-E-Naser, S.F., Khan, M.S., 2017. Pesticide food laws and regulations. In: *Pesticide Residue in Foods*. Springer International Publishing, Cham, pp. 37–51. https://doi.org/10.1007/978-3-319-52683-6_3
- 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.
- KABALUK, J.T., Ericsson, J.D., 2007. Seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. *Agron. J.* 99, 1377–1381.
- KIM, J.J. 2007. Influence of *Lecanicillium attenuatum* on the development and reproduction of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *BioControl*, 789-799.
- Kumar, V., Kumar, P., 2019. Pesticides in agriculture and environment: Impacts on human health. In: Kumar, V., Kumar, R., Singh, J., Kumer, P. (Eds.), *Contaminants in Agriculture and Environment: Health Risks and Remediation*. Agriculture and Environmental Science Academy, Haridwar, India, pp. 76–95. <https://doi.org/10.26832/AESA-2019-CAE-0160-07>.
- KRELL, V., Jakobs-Schoenwandt, D., Vidal, S., Patel, A. V. (2018). Encapsulation of *Metarhizium brunneum* enhances endophytism in tomato plants. *Biological Control*, 116: 62-73.
- LACEY, L.A. (Ed.) (2017). *Microbial control of insect and mite pests- from theory to practice*. Elsevier, London. 461p.

- LACEY, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132: 1-41.
- MANSANO, A. S.; MOREIRA, R. A.; PIEROZZI, M.; OLIVEIRA, T. M. A.; ROCHA, O.; REGALI-SELEGHIM, M. H. Effects of diuron and carbofuran pesticides in their pure and commercial forms on *Paramecium caudatum*: The use of protozoan in ecotoxicology. *Environmental Pollution*, [S.L.], v. 213, p. 160-172, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.054>.
- OMOMOWO, O. I.; BABALOLA, O. O. Bacterial and Fungal Endophytes: tiny giants with immense beneficial potential for plant growth and sustainable agricultural productivity. *Microorganisms*, [S.L.], v. 7, n. 11, p. 481, 23 out. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms7110481>
- PARSA, S., Ortiz, V., Gómez-Jiménez, M. I., Kramer, M., Vega, F. E. (2018). Root environment is a key determinant of fungal entomopathogen endophytism following seed treatment in the common bean, *Phaseolus vulgaris*, *Biological Control*, 116: 74-81.
- PELIZZA, S. A.; MARIOTTINI Y.; RUSSO, L. M.; VIANNA, F.; SCORSETTI, A. C.; LANGE, C. E. *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) Introduced as an Endophyte in Corn Plants and Its Effects on Consumption, Reproductive Capacity, and Food Preference of *Dichroplus maculipennis* (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae). *Journal of Insect Science*, v. 17, n. 2, p. 1-6, mar. 2017
- POVEDA, J. *Trichoderma* as biocontrol agent against pests: New uses for a mycoparasite. *Biological Control*, [S. L.], v. 159, p. 1-8, ago. 2021.
- PRINCE, G.; CHANDLER, D. Susceptibility of *Myzus persicae*, *Brevicoryne brassicae* and *Nasonovia ribisnigri* to Fungal Biopesticides in Laboratory and Field Experiments. *Insects*, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 55, 17 jan. 2020.
- RANDO, J. S. S.; LIMA, C. B. de; BATISTA, N. de A.; FELDHAUS, D. C.; LOURENÇO, C. C. de; POLONIO, V. D.; ÁVILA, R. R.; MALANOTTE, M. L. Extratos vegetais no controle dos afídeos *Brevicoryne brassicae* (L.) e *Myzus persicae* (Sulzer).

Semina: Ciências Agrárias, v. 32, n. 2, p. 503-512, 2011. Universidade Estadual de Londrina

RUSSO, M.L., Pelizza, S.A, Vianna, M. F., Allegrucci, N., Cabello, M.N., Toledo, A. V., Mourellos, C., Scorsetti, A. C. (2019). Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) Merr. growth and yield. Journal of King Saud University - Science, 31: 728-736.

SANCHEZ-PENA SR, Lara J SJ, Medina RF. (2011). Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, Mexico, and their virulence towards thrips and whiteflies. Journal of Insect Science, 11: 1-10.

SARFRAZ, M., Dossdall, L. M., & Keddie, B. A. (2006). Diamondbackmoth–host plant interactions: Implications for pest management. Crop Protection, 25: 625–639.

SIDNEY, A. L. Qualidade de diferentes espécies de pulgões como hospedeiros do parasitoide *Aphidius ervi* Haliday e competição larval entre *A. ervi* e *Praon volucre* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) em *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Homoptera: Aphididae). Lavras: UFLA, 46 p., 2009.

SHAH, P.A., Pell, J.K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. Applied Microbiology and Biotechnology, 61: 413-423.

TEIXEIRA, N.C., Valim, J.O.S., Oliveira, M.G.A., Campos, W.G. 2019. Combined effects of soil silicon and drought stress on host plant chemical and ultrastructural quality for leaf-chewing and sap-sucking insects. Journal of Agronomy and Crop Science, 206: 187-201.

UPADHYAY, R.K (ed.) Advances in microbial control of insect pests. Springer, New York. 330 p.

VALIM, J.O.S., Teixeira, N.C., Santos, N.A., Oliveira, M.G.A., Campos, W.G. (2016). Drought-induced acclimatization of a fast-growing plant decreases insect performance in leaf-chewing and sap-sucking guilds. Arthropod-Plant Interactions, 10: 351-363.

- VEGA, F. E. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. *Mycology*, [S. L.], v. 111 p. 4-30, jul. 2018
- WANI, Z.A., Ashraf, N., Mohiuddin, T., Riyaz-UI-Hassan, S., 2015 Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2955–2965.
- ZALUCKI, M.Y., Shabbir, A., Silva, R., Adamson, D., Shu-Sheng, L., Furlong, M.J. (2012) Estimating the economic cost of one of the world's major insect pests, *Plutellaxylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): just how long is a piece of string? *Journal of Economic Entomology* 105:1115-1129.
- ZIMMERMANN, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhiziumanisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17:879-920.
- Zhan, J., Thrall, P.H., Burdon, J.J., 2014. Achieving sustainable plant disease management through evolutionary principles. *Trends Plant Sci.* 19, 570–575. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2014.04.010>.