

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

**Colonização endofítica de fungos entomopatogênicos em soja
Glycine max. (L.) e efeitos em *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa
armigera***

Rodrigo Takao Uemura

Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia
Agrônoma da Escola Superior de Agricultura “Luiz
de Queiroz” da Universidade de São Paulo.

**Piracicaba
2016**

Rodrigo Takao Uemura

**Colonização endofítica de fungos entomopatogênicos em soja
Glycine max. (L.) e efeitos em *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa
armigera***

Orientador:
Prof. **ITALO DELALIBERA JR.**

Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia
Agrônômica da Escola Superior de Agricultura “Luiz
de Queiroz” da Universidade de São Paulo.

**Piracicaba
2016**

Sumário

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | 3 |
| 1 INTRODUÇÃO | 4 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 7 |
| 2.1 Fungos entomopatogênicos e interações em ambientes agrícolas | 7 |
| 2.2 Fungos entomopatogênicos e relação endofítica com plantas | 10 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 11 |
| 3.1 Origem e preparação do material fúngico | 11 |
| 3.2 Inoculação dos fungos entomopatogênicos | 12 |
| 3.3 Semeadura e desenvolvimento das plantas utilizadas..... | 12 |
| 3.4 Determinação da colonização dos fungos entomopatogênicos e localização em plantas de soja..... | 13 |
| 3.5 Experimento de análise do consumo de área foliar e ganho de peso em placas de Petri utilizando discos de folha..... | 14 |
| 3.6 Análise do desenvolvimento de <i>C. includens</i> em plantas de soja inoculadas com fungos entomopatogênicos..... | 16 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 18 |
| 4.1 Colonização dos fungos entomopatogênicos e localização em plantas de soja | 18 |
| 4.2 Consumo foliar e ganho de peso de lagartas <i>C. includens</i> e <i>H. armigera</i> utilizando discos de folhas | 20 |
| 4.3 Ganho de peso de lagartas <i>C. includens</i> alimentadas diretamente em plantas de soja..... | 23 |
| 5 CONCLUSÕES | 26 |
| REFERÊNCIAS..... | 27 |

RESUMO

A soja (*Glycine max.* L.) é uma das culturas mais importantes no agronegócio mundial e fundamental para a economia brasileira. Nos últimos anos, as lagartas *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera*, têm causado prejuízos significativos à cultura da soja. Os fungos entomopatogênicos são importantes agentes naturais que controlam os níveis populacionais de diversos insetos, apresentando interações complexas e com alto potencial para aproveitamento no controle de pragas na agricultura. Diante deste cenário, o presente estudo objetivou caracterizar a colonização endofítica de fungos entomopatogênicos inoculados via solo em plantas de soja, bem como analisar possíveis efeitos nestas duas pragas da soja, visando uma melhor compreensão das relações entre fungos entomopatogênicos, plantas e pragas. Para isto foram realizados 3 experimentos. No primeiro avaliou-se a colonização dos fungos entomopatogênicos (*Beauveria bassiana* ESALQ-3399, *Isaria fumosorosea* ESALQ-3422 e *Metarhizium sp. indet. 1* ESALQ-1638) e determinou-se localização em partes das plantas de soja. No segundo, determinou-se o consumo foliar e ganho de peso de *C. includens* e *H. armigera* quando alimentadas em discos de folhas retirados de plantas inoculadas com os fungos entomopatogênicos. E no último, avaliou-se o ganho de peso de lagartas de *C. includens* alimentadas diretamente em plantas inteiras inoculadas com os fungos. Os três fungos testados, foram detectados nas plantas de soja. O isolado *I. fumosorosea* ESALQ-3422 demonstrou se translocar pela planta e com ocorrência restrita às raízes e caules das plantas. O isolado *Metarhizium sp. indet. 1* ESALQ-1638 foi encontrado simultaneamente na raiz, caule e folhas aos 35 dias após a inoculação. O isolado *B. bassiana* ESALQ-3399, foi capaz de colonizar raízes, caules e folhas, sendo encontrado em frequência de até 83% nas folhas. A área dos discos foliares consumida por lagartas de *H. armigera* em placas de petri variou de 3,29 cm²/dia em no tratamento com *I. fumosorosea* ESALQ – 3422 a 4,62 cm²/dia no tratamento com *Metarhizium sp. indet. 1* ESALQ – 1638, no entanto sem apresentar diferenças estatísticas. Já entre lagartas de *C. includens*, o menor consumo ocorreu no tratamento controle (4,94 cm²/dia) e o maior (7,53 cm²/dia) em plantas tratadas com *B. bassiana* ESALQ – 3399. Os pesos das lagartas *C. includens* alimentadas em plantas inoculadas com os fungos não diferiram significativamente, sendo em média de 83,3 mg no Controle, 94,0 mg em *B. bassiana*, 108,1 mg em *Metarhizium* e 131,9 mg em *I. fumosorosea*. Conclui-se que estes fungos entomopatogênicos são capazes de colonizar endofiticamente as plantas de soja, entretanto maiores estudos são necessários para elucidar a natureza destas relações.

Palavras-chave: Controle microbiano; *Isaria fumosorosea*; *Metarhizium*; *Beauveria bassiana*; inoculantes; fungos endofíticos

1 INTRODUÇÃO

A soja, *Glycine max.* (L.), é uma das principais culturas no mundo e o Brasil é o segundo maior produtor do grão. Em 2015, a produção mundial da oleaginosa alcançou cerca de 313 milhões de toneladas, em que 34% e 31% deste valor, respectivamente, foram produzidos por Estados Unidos e Brasil, os dois maiores produtores da cultura (United States Department of Agriculture – USDA, 2016). A soja é um dos principais produtos exportados pelo Brasil e um elemento essencial na economia brasileira. No ano passado, o país exportou mais de 54 milhões de toneladas da commodity, valor equivalente à aproximadamente 21 bilhões de dólares (Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior – MDIC, 2016). No entanto, apesar dos resultados expressivos, fatores negativos como o surto de insetos-praga, limitam o melhor desempenho econômico da atividade.

O Brasil é um país predominantemente tropical, clima que favorece o desenvolvimento de inúmeras espécies de insetos. Quando estas espécies ocorrem em elevados níveis populacionais e causam prejuízos econômicos, são consideradas como pragas. A soja é hospedeira para vários artrópodes e suas lavouras sofrem pressão por ataque de diferentes pragas durante todo o seu ciclo, o que pode reduzir significativamente o rendimento da cultura (MOSCARDI et al., 2013). Cerca de 35 insetos-pragas são consideradas como relevantes nas lavouras da oleaginosa e o nível de ocorrência de cada uma pode variar de acordo com fatores regionais, como sistema de cultivo adotado, variações regionais de clima e características do solo (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, 2013).

No cenário nacional, a maioria dos artrópodes fitófagos que a soja hospeda são desfolhadores. Os danos relacionados à desfolha inferem, principalmente, em redução da área foliar fotossinteticamente ativa e consequente diminuição da síntese de nutrientes, o que pode comprometer o desenvolvimento da planta e a produtividade (MOSCARDI et al., 2013). Além da redução na produção de grãos, as pragas desfolhadoras também são responsáveis por aumento significativo nos investimentos em defensivos, uma vez que os danos causados podem ser visivelmente observados levando agricultores à errônea aplicação abusiva de

inseticidas (PANIZZI et al., 1977; MARQUES, 1978 e PANIZZI, 1980 apud REICHERT e COSTA, 2001).

Dentre as pragas desfolhadoras da soja, se encontram as lagartas (Lepidóptera: Noctuidae), que são consideradas como umas das mais importantes da cultura devido aos danos que podem causar quando não são devidamente manejadas. Duas importantes espécies são a *Chrysodeixis includens* (Walker) e a *Helicoverpa armigera* (Hübner), que tem causado danos significativos nos últimos anos. Durante a safra de soja de 2013/14, na região do cerrado brasileiro, as duas lagartas foram o foco da atenção dos produtores e, somado à instabilidade climática, causaram grandes prejuízos aos sojicultores. De acordo com dados do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – CEPEA (2014), em 2013 o desembolso com inseticidas na cultura da soja na região de Rio Verde (GO), foi de aproximadamente R\$ 200,00/hectare e, algo em torno de 65% deste valor destinados apenas à produtos para o controle populacional de lagartas.

A lagarta *Chrysodeixis includens*, pertencente à subfamília *Plusiinae* (popularmente conhecidas como falsas-medideiras), é a principal espécie deste complexo sendo encontrada com alta frequência nas lavouras de soja (BERNARDI, 2012). Apesar de ter sido considerada como praga-secundária da soja durante muito tempo, a partir da década de 90 a espécie passou a ser considerada como primária, principalmente devido as alterações no sistema produtivo envolvendo o aumento no uso de defensivos agrícolas (MOSCARDI et al., 2013).

Outra subfamília de lagartas que recentemente tem se destacado como pragas-chaves de diversas culturas, dentre elas a soja, é a *Heliiothinae*, em especial a espécie *Helicoverpa armigera* (ÁVILA; VIVAN e TOMQUESLK, 2013). A *H. armigera* é extremamente agressiva e, além de estruturas vegetativas (folhas), também se alimentam de flores e vagens da soja, intensificando os danos causados. A espécie era considerada como praga quarentenária A1 – praga exótica – no Brasil até a safra de 2012/13 (CZEPAK et al, 2013), no entanto, em 2012, em meio ao contínuo manejo inadequado de defensivos e à carência de rotação de culturas (além da soja, milho e algodão), a espécie foi registrada na região do Cerrado em densidades populacionais alarmantes, o que gerou um grave prejuízo naquela safra

(EMBRAPA, 2016). O episódio criou um estado de alerta em todo o setor e enfatizou a questão do uso indiscriminado de químicos.

Em sistemas de cultivo intensivo, como é o caso da maioria das lavouras de soja no Brasil, o controle de pragas é realizado essencialmente através do uso de inseticidas químicos. O uso abusivo de defensivos de amplo espectro de ação tem reduzido populações de inimigos naturais das pragas, levando ao desequilíbrio dos agrossistemas e à surtos populacionais de pragas, antes consideradas como secundárias (BUENO et al., 2007 apud MOSCARDI et al., 2013). Adicionalmente, o aumento expressivo no número de aplicações de fungicidas após o surgimento da ferrugem-asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & P. Sydow), foi um acontecimento relevante para a contribuição da redução do controle populacional de pragas realizado por microrganismos entomopatogênicos naturalmente presentes no sistema (MOSCARDI et al., 2013). Desta maneira, se destaca a necessidade da busca por métodos de controle alternativas aos químicos.

Os fungos entomopatogênicos são organismos de ocorrência natural em diversos ambientes, inclusive em lavouras de produção agrícola. Estes microrganismos são capazes de infectar diversas espécies de insetos-pragas e manter os níveis populacionais destas em equilíbrio através de epizootias no campo, assim, possuem a habilidade de serem utilizados como agentes de controle biológico de pragas (ALVES, 1998). Em geral, estudos envolvendo os fungos entomopatogênicos objetivam à seleção de isolados que sejam eficientes contra pragas que causam danos econômicos e, simultaneamente, sejam compatíveis com defensivos químicos, para que assim, possam ser utilizados como biopesticidas em programas de manejo integrado de pragas. Desta forma, o número de trabalhos que procura compreender as relações destes fungos com as culturas e os agroecossistemas é limitado.

O solo é considerado como um reservatório natural de fungos entomopatogênicos (HAJEK, 1997) e diversas espécies dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Isaria* foram encontrados em habitats naturais ou agroecossistemas (MEYLING e EILENBERG, 2007). Múltiplos estudos foram conduzidos para estudar a ocorrência natural dos fungos entomopatogênicos no mundo, observando que a espécie fúngica *Metarhizium anisopliae* ocorre mais em áreas agrícolas enquanto

Isaria spp. é mais frequente em ecossistemas de florestas. Além disso, foi demonstrado que a espécie *B. bassiana* pode ocupar uma grande diversidade de habitats (MEYLING e EILENBERG, 2006; MEDO e CAGAN, 2011). A ocorrência natural e persistência dos fungos entomopatogênicos no solo dependem de vários fatores, tais como, a localização geográfica, clima, habitat, altitude, pH do solo, e a presença de hospedeiros primários ou alternativos (INGLIS et al., 2001; MEDO & CAGAN, 2011). O uso indiscriminado de defensivos químicos nas lavouras é um importante fator que altera algumas destas condições do ambiente e conseqüentemente limitam a ação destes fungos, que naturalmente restringem surtos populacionais de insetos-pragas. Assim, é necessário a busca por alternativas sustentáveis que estimulem o equilíbrio natural dos agroecossistemas.

Neste contexto, o presente estudo objetivou verificar a ocorrência e distribuição na planta de interações endofíticas entre fungos entomopatogênicos inoculados via solo em semeadura e plantas de soja, bem como analisar os efeitos desta inoculação em duas importantes pragas da sojicultura, visando a melhor compreensão das relações entre fungos entomopatogênicos, plantas e pragas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungos entomopatogênicos e interações em ambientes agrícolas

Os fungos entomopatogênicos possuem adaptações e habilidades apropriadas que potencializam à ocorrência de epizootias naturais, auxiliando na manutenção do equilíbrio dos níveis populacionais de artrópodes, inclusive o de pragas de plantas cultiváveis. Cadáveres de insetos infectados por fungos liberam estruturas reprodutivas que, ao serem disseminadas através do vento, água ou superfície de hospedeiros, podem dar início a novos ciclos de infecção em outros insetos (HAJEK e St. LEGER, 1994). Adicionalmente, os fungos entomopatogênicos podem persistir no solo por longos períodos de tempo (MEYLING e EILENBERG, 2006; MEDO e CAGAN, 2011) e desenvolver associações com as raízes das plantas (St. LEGER, 2008; BRUCK, 2010) ocasionando benefícios no crescimento da planta (SASAN e BIDOCHKA, 2012), na aquisição de nutrientes (FANG e St. LEGER,

2010; BEHIE et al., 2012; BEHIE e BIDOCHKA, 2014), proteção contra fitopatógenos (SASAN e BIDOCHKA, 2013), herbivoria (PARSA et al. 2013) e estresse abióticos (KHAN et al., 2012).

Os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Paecilomyces lilacinus* foram reportados por ocorrer naturalmente em plantações de soja com plantio direto e convencional (SOSA-GÓMEZ et al., 2001). O potencial destes patógenos como agentes de controle de pragas foi demonstrado por Sosa-Gómez e Moscardi, onde os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* infectaram os coleópteros desfolhadores *Ceotoma sp*, *Colaspis sp.*, e *Diabrotica speciosa* (SOSA-GÓMEZ e MOSCARDI, 1994), e os percevejos *Nezara viridula*, *Piezodorus guidinii* e *Euschistus heros* (SOSA-GÓMEZ e MOSCARDI, 1998). Assim mesmo, o fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi* (antigamente *Nomurea rileyi*) foi relatado como um inimigo natural das lagartas da soja *Anticarsia gemmatalis*, principalmente em condições de tempo úmido (SOSA-GÓMEZ et al., 2003). Até o momento, existe um único trabalho realizado por Khan et al. (2012) que demonstrou que plantas de soja inoculadas com *M. anisopliae* LHL07 apresentaram maior crescimento, maiores concentrações de clorofila, taxa de transpiração e fotossintética em condições de estresse salino.

A relação entre os fungos entomopatogênicos e outros organismos inseridos no mesmo ecossistema é complexa e influenciada por interações multitróficas moduladas por fatores bióticos e abióticos (HESKETH et al., 2010). As relações entre fungos e plantas que ocorrem no solo estão entre as mais estudadas e conhecidas. Considerando a persistência dos fungos entomopatogênicos no solo, Bruck (2005) inoculou *M. anisopliae* em campo e verificou a persistência deste patógeno por até 342 dias após o tratamento do solo. Estudos mais recentes conduzidos pelo mesmo autor indicaram que o uso de fungos entomopatogênicos aplicados no solo, poderia diminuir em cerca de 10 vezes a quantidade usualmente utilizada para o controle biológico de pragas. Desta forma, poderia se obter melhores resultados em um controle mais efetivo de insetos que se alimentam de raízes de plantas sem nenhum custo adicional de produto ou aplicação (BRUCK, 2010).

A rizosfera é definida como a região do solo próxima as raízes da planta e que se encontra diretamente influenciados por secreções ou exsudados das raízes

(BRUCK, 2010). Os primeiros relatos sobre a associação do fungo *M. anisopliae* na rizosfera foram realizados por Hu e St. Leger (2002), onde o fungo foi marcado com uma proteína verde fluorescente (GFP) e mostraram a persistência de *M. anisopliae* ao longo do tempo em campo, além de sua maior afinidade com a rizosfera das plantas, do que com o solo. Adicionalmente, Bruck (2010) demonstrou que as espécies do gênero *Metarhizium* são patógenos facultativos, ou seja, o fungo pode causar a morte do hospederio e, também, sobreviver saprofiticamente no solo ou associado a rizosfera. Hu & St. Leger (2002) sugeriram que a disponibilidade do fungo *M. anisopliae* na rizosfera das plantas exibe uma resposta positiva aos exsudados da planta, sendo uma fonte de nutrientes inorgânicos e orgânicos para o fungo. A quantidade e composição de exsudatos radiculares que entram no solo dependem da espécie de planta, sua idade e estado nutricional, o qual poderia estar influenciando a microbiota do solo e as populações de fungos entomopatogênicos (BRUCK, 2010). Wyrebek et al. (2011) demonstraram que as espécies de *M. robertsii*, *M. anisopliae* e *M. guizhouense* se encontraram em associação exclusiva com a rizosfera das plantas e que estes patógenos não apresentavam uma distribuição aleatória no solo, indicando especificação nas interações entre as espécies fúngicas e as plantas.

Em troca pelos nutrientes fornecidos pela planta, os microrganismos podem ajudar na solubilização de nutrientes inorgânicos e na absorção destes pela planta (St. LEGER, 2008). Trabalhos recentes demonstraram que os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* são capazes de matar e infectar insetos de solo e, subsequentemente, transferir derivados de nitrogênio de insetos para plantas através de seu micélio em uma interação tritrófica entre os insetos hospedeiros, rizosfera e plantas (BEHIE et al., 2012; BEHIE e BIDOCHKA, 2013). Behie e Bidochka (2014) reportaram a transferência de quantidades significativas de nitrogênio de insetos mortos para as plantas, sugerindo a criação de um ramo adicional ao ciclo do nitrogênio no solo e, que esta transferência pode ser importante para plantas que sobrevivem em solos pobres em nitrogênio. Outra opção para aumentar a aquisição de nutrientes pela planta é a proliferação de pelos radiculares, a qual foi maior em plantas tratadas com suspensões de conídios de *M. robertsii* em comparação com as plantas não tratadas (SASAN e BIDOCHKA, 2012).

2.2 Fungos entomopatogênicos e relação endofítica com plantas

Além das interações entre os fungos entomopatogênicos e a rizosfera, os fungos entomopatogênicos também podem se associar com a planta através de uma relação endofítica sem efeitos deletérios à planta. Algumas espécies de fungos foram relatadas como de ocorrência natural em plantas, enquanto outras têm sido introduzidas pela aplicação de suspensões de conídios nas sementes ou no solo (VEGA, 2008). O fungo *B. bassiana* foi descrito como endofítico em plantas de milho, batata, algodão, tomate, sorgo, tamareira, banana, cacau, papoula, café e pinho (JARONSKY, 2007; VEGA et al., 2008 & 2009, OWNLEY et al., 2008; BROWNBRIDGE et al., 2012), e espécies do gênero *Isaria* foram isoladas a partir de árvores da espécie *Carpinus caroliniana* e café (BILLS e POLISHOOK, 1991; VEGA et al., 2008). Estudos recentes também demonstraram uma associação endofítica benéfica de *M. anisopliae* e *M. robertisii* nas raízes, pecíolos, folhas e caule das plantas (SASAN e BIDOCHKA, 2012; BATTA, 2013).

A colonização de fungos entomopatogênicos nas plantas ocasiona diversos efeitos para as plantas que podem ser associados à mecanismos diretos, como a produção de fitormônios que resultam em um aumento na taxa de germinação das sementes, crescimento de raízes e parte aérea da planta (SASAN e BIDOCHKA, 2012), e indiretos, que envolvem relações antagonistas com fitopatógenos (SASAN e BIDOCHKA, 2013) e o controle de pragas (PARSA et al., 2013). Os primeiros estudos conduzidos com o fungo *B. bassiana* em plantas de milho (*Zea mays* L.) demonstraram que 1% dos conídios de *B. bassiana*, aplicados em forma de suspensão nas folhas, foram capazes de germinar e penetrar na cutícula das mesmas. Uma vez dentro da planta, as hifas se desenvolveram no interior do apoplasto e algumas até alcançaram o xilema, podendo colonizar toda a planta através do crescimento dentro dos vasos condutores (BRUCE e LEWIS, 2000). Estas relações endofíticas podem beneficiar as plantas promovendo melhorias ao seu sistema de defesa através da competição com fitopatógenos, produção de metabólitos e indução de resistência sistêmica, além de poder elevar o porte da planta por meio da indução ou síntese de substâncias reguladoras do crescimento (POLLI et al., 2012). Estudos de Jaronsky (2007) demonstraram que, após sementes de tomate serem inoculadas com suspensões de conídios de *B. bassiana* e

cultivadas em casas de vegetação e em campo, as plantas apresentaram relações endofíticas com o fungo e maior porte em relação às plantas não tratadas. Além disso, Azevedo e Maccheroni Jr. (s.d.) citam que plantas de milho inoculadas via injeção e aspersão foliar com *B. bassiana*, apresentaram o fungo em relação endofítica colonizando diferentes partes das plantas, e ainda demonstraram a capacidade de reduzir o ataque de *Ostrinia nubilalis* (broca europeia do milho).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem e preparação do material fúngico

Os fungos entomopatogênicos dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Isaria* foram obtidos da coleção de entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ – USP, Piracicaba (SP), conforme descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos isolados utilizados no estudo

| Espécie fúngica | Nº de registro | Origem | Local de coleta |
|---------------------------------|----------------|-------------------|-----------------|
| <i>Metarhizium sp. indet. 1</i> | ESALQ-1638 | Solo de vegetação | Rio Verde- GO |
| <i>Isaria fumosorosea</i> | ESALQ-3422 | Solo de citros | Itirapina- SP |
| <i>Beauveria bassiana</i> | ESALQ-3399 | Solo de citros | Itirapina- SP |

Os fungos foram cultivados em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA, Difco, USA) e incubados em câmara climatizada tipo B.O.D. (Biological Oxygen Demand) a 26 °C e 12 horas de fotofase por 7 a 10 dias.

Para confirmar a viabilidade dos fungos utilizados nos experimentos foi avaliada a porcentagem de germinação dos conídios de acordo com a metodologia de Alves et al. (1998) e Oliveira et al. (2015). Para isso foram utilizadas placas de Petri tipo Rodac® contendo 4 ml de meio de cultura BDA mais o fungicida Derosal® 500 SC (10 microlitros.L⁻¹) (princípio ativo Carbendazim, Bayer CropScience, SP, Brasil) e incubadas com suspensões de 1x10⁶ conídios/ml de cada espécie fúngica. Posteriormente, as placas foram mantidas em câmara tipo B.O.D por 24h a 26° C e 12h de fotofase. O número de conídios germinados e não germinados foi

quantificado em microscópio ótico com objetiva de 400X, estimando-se a porcentagem de conídios germinados. Em todos os experimentos, as suspensões de conídios das três espécies utilizadas alcançaram porcentagem de viabilidade superior a 90%.

3.2 Inoculação dos fungos entomopatogênicos

A inoculação dos fungos entomopatogênicos foi realizada através da aplicação direta de suspensão de conídios no substrato (TEFERA e VIDAL, 2009; PARSA et al., 2013), simultaneamente à semeadura.

As suspensões de conídios de cada um dos fungos entomopatogênicos foram preparadas a partir da raspagem dos conídios produzidos em meio de cultura (item 3.1.1). Para isso, foram realizadas diluições seriadas utilizando água estéril com o espalhante adesivo Tween 80 a 0,01%. A concentração de conídios foi ajustada a 1×10^8 conídios/ml através da determinação do número de conídios sob uma câmara de Neubauer no microscópio de luz.

A inoculação de cada tratamento foi feita pela aplicação direta de 2 ml da suspensão de 1×10^8 conídios/ml sobre a superfície do substrato, logo após a semeadura das sementes. No caso dos controles negativos (controle sem fungos), foram aplicados 2 ml da solução de água estéril com Tween 80 a 0,01%.

3.3 Semeadura e desenvolvimento das plantas utilizadas

A variedade utilizada no experimento foi a soja convencional BRS 284, e as sementes obtidas da EMBRAPA soja, Londrina (PR).

Foram semeadas 3 sementes de soja por vaso, em profundidade em torno de 2 cm, em vasos (recipientes plásticos) contendo 180 g do substrato (Tropstrato HT Hortaliças- Vida Verde®, Brasil).

Após a semeadura e inoculação dos fungos, todos os vasos foram mantidos em uma casa-de-vegetação (**Figura 1**) com entrada de ar forçada e resfriamento/umidificação tipo pad-fan (Van der Hoeven - Estufas Agrícolas), até o

momento de utilização das plantas nos experimentos. As plantas foram irrigadas diariamente e, 7 dias após a inoculação foram eliminadas as plântulas com menor vigor, selecionando-se apenas a mais vigorosa do vaso para a condução dos experimentos. A cada 10 dias, os substratos foram fertilizados com 5 ml de solução do adubo N.P.K 20:20:20 (1g/L) por vaso.



Figura 1 – Sementes recém semeadas e inoculadas em recipientes plásticos contendo substrato

3.4 Determinação da colonização dos fungos entomopatogênicos e localização em plantas de soja

Para avaliação da colonização e localização dos fungos entomopatogênicos dos gêneros *Metarhizium*, *Isaria* e *Beauveria* nas plantas de soja, foi utilizada a metodologia descrita por Tefera e Vidal (2009) com algumas modificações. Para cada tratamento foram selecionados três vasos escolhidos ao acaso, totalizando 3 plantas por tratamento. As plantas foram removidas cuidadosamente do substrato e lavadas com água destilada para remover o excesso de substrato. Posteriormente, de cada planta foram cortadas duas secções (de aproximadamente 2 cm de comprimento) de folhas, duas de caule e duas das raízes, totalizando 18 fragmentos vegetais por tratamento. Os fragmentos foram esterilizados superficialmente com álcool a 70% por 2 minutos, seguido de hipoclorito de sódio a 5% por 3 minutos e novamente álcool a 70% por 2 minutos, finalizando com duas lavagens em água destilada estéril por 2 minutos. Após a desinfecção superficial, os fragmentos vegetais foram secados dentro de um fluxo laminar por 15 minutos e transferidos

para placas de Petri contendo meio de cultura seletivo descrito por Behie et al. (2015), constituído de meio BDA (Difco, USA) a 39g/L, Ciclohexamida a 0,5 g/L, Cloranfenicol a 0,2 g/L, Dodine 65% a 0,5 g/L e Cristal Violeta a 0,01 g/L. Todas as placas contendo o material vegetal foram incubadas em câmara climatizada tipo BOD a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase por 15 dias.

Após 15 dias em BOD, foi avaliada a recuperação dos fungos entomopatogênicos a partir dos tecidos vegetais e a confirmação de cada espécie fúngica foi realizada mediante observação das estruturas reprodutivas dos fungos (conidióforos e conídios).

A frequência de colonização dos fungos entomopatogênicos foi determinada a partir do número de fragmentos colonizados confirmados em relação ao número total de fragmentos por planta e expressa em percentagens.

Para a análise da colonização dos fungos entomopatogênicos em relação endofítica com plantas de soja, foram realizadas 3 avaliações (conforme procedimentos descritos no item 3.1.3) ao longo do tempo. As plantas foram semeadas e inoculadas em 11 de março de 2016. A primeira avaliação foi realizada com plantas de 7 dias após a semeadura, plantas em estágio fenológico V1 (folhas unifoliadas completamente desenvolvidas). A segunda avaliação foi realizada com plantas de 20 dias após a semeadura, plantas em estádios V3 (segunda folha trifoliada completamente desenvolvida) e V4 (terceira folha trifoliada completamente desenvolvida). E a última avaliação feita com plantas de 35 dias após a semeadura/inoculação, plantas em estádios de V6 (quinta folha trifoliada completamente desenvolvida).

3.5 Experimento de análise do consumo de área foliar e ganho de peso em placas de Petri utilizando discos de folha

As lagartas das espécies *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera* foram obtidas, respectivamente, no Laboratório de Biologia dos Insetos e Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ – USP, Piracicaba. As lagartas de *C. includens* e *H. armigera* foram adquiridas recém eclodidas e mantidas em recipientes plásticos contendo

dietas artificiais. Os recipientes tampados contendo lagartas e dieta permaneceram em BOD, a temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase até que atingissem o terceiro instar. Após as lagartas atingirem o terceiro instar, foram transferidas para placas de Petri (9 mm) de plástico com tampa, uma lagarta por placa (Figura 2). As placas de Petri foram anteriormente esterilizadas com soluções de álcool 70%. Papéis filtro estéreis em formato de circunferência, foram colocados ao fundo das placas e umedecidos com água estéril para a manutenção da umidade interna e assim as folhas não desidratassem.

Plantas de soja, com 20 dias após a semeadura e inoculação das 3 espécies fúngicas e o controle negativo, foram utilizadas para o experimento de consumo folhar das lagartas *C. includens* e *H. armigera*. Com o auxílio de um cortador de discos, de diâmetro conhecido (3,6 cm), folíolos do segundo trifólio das plantas de soja foram recortadas em circunferências e em seguida transferidas para as placas de petri contendo as lagartas (1 disco foliar/placa).

As lagartas foram pesadas uma a uma, em balanças de alta precisão, antes de serem transferidas para as placas de Petri contendo os discos de folha, obtendo-se assim o peso inicial de cada repetição. Para cada repetição foi considerada uma lagarta por placa. Foram realizadas 10 repetições por tratamento para cada espécie de lagarta, resultando um total de 80 repetições. Os tratamentos foram: controle negativo, *Isaria fumosorosea* ESALQ-3422, *Beauveria bassiana* ESALQ-3399 e *Metarhizium sp. indet. 1* ESALQ-1638.

Após as lagartas serem transferidas para as placas de Petri (Figura 2), estas foram mantidas em BOD a temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase por um período de 24h. Após 24h, as lagartas foram novamente pesadas, a área dos restos vegetais (após consumo pelas lagartas) do disco de folha foram lidos no aparelho e depois descartados e novos discos foliares (recém cortados) inseridos nas placas. As placas foram novamente levadas às mesmas condições em BOD, por mais 24h. Após este período, as lagartas foram pesadas novamente e a área dos restos vegetais determinadas.

Para a determinação da área foliar foram utilizados dois discos sem consumo e, as leituras foram realizadas através de um aparelho medidor de área foliar (Portable Leaf Area Meter LI-3000C, LI-COR), cada disco teve sua área lida cinco

vezes, e a média das leituras (10,24 cm²) considerada como a área foliar inicial. Para o cálculo do consumo foliar, foi considerada a área média (10,24 cm²) dos discos intactos subtraídos das leituras dos discos consumidos após 24h da liberação dos insetos. O consumo foliar médio de cada tratamento foi calculado a partir das médias registradas em cada dia de avaliação.

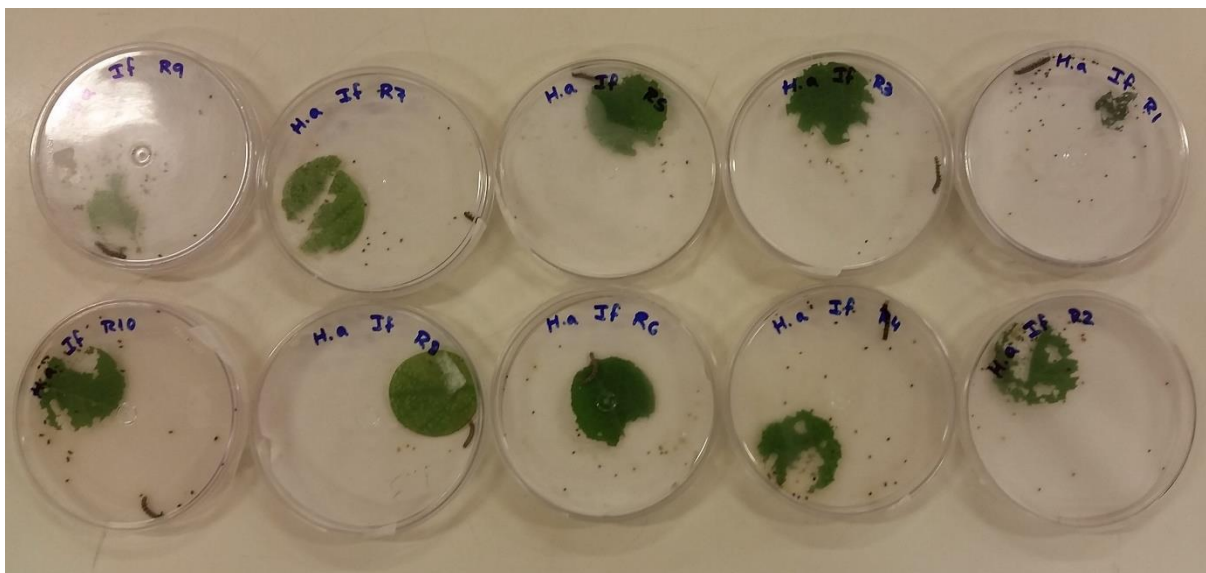


Figura 2 – Experimento em placas de Petri com lagartas de *C. includens* e *H. armigera*

3.6 Análise do desenvolvimento de *C. includens* em plantas de soja inoculadas com fungos entomopatogênicos

Ao início do experimento, as plantas estavam no vigésimo dia após a inoculação/semeadura. Foram selecionados aleatoriamente 3 vasos por tratamento (3 plantas por tratamento) para realização de teste de colonização conforme procedimentos citados no item 3.3.

As plantas de soja (1 por vaso) tiveram o substrato isolado (Figura 3) para que não houvesse o contato, e possível contaminação, das lagartas com o solo. Além disso, as lagartas foram aprisionadas às plantas através de tecido tipo voal. As lagartas recém eclodidas (primeiro instar) de *Chrysodeixis includens* foram obtidas no Laboratório de Biologia dos Insetos Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ – USP, Piracicaba. As lagartas foram pesadas em balança de alta precisão, para a obtenção dos valores iniciais de peso. Devido ao tamanho muito

pequeno das lagartas, e peso praticamente insignificante, inicialmente, foram pesadas cinco lagartas de cada tratamento e a média foi considerada como peso inicial de cada tratamento. Cada planta recebeu uma lagarta e cada vaso constituiu uma repetição. Os tratamentos consistiram das 3 espécies fúngicas e o controle negativo, cada tratamento apresentou 24 repetições.

As plantas com as lagartas foram mantidas em uma sala de condução de bioensaios (Figura 4) à temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase, sendo diariamente irrigadas. As avaliações de peso foram realizadas em frequência de 2 em 2 dias até que a planta atingisse um nível de desfolha crítico, ocorrido em 9 dias após a liberação dos insetos nas plantas.



Figura 3 – Substrato de plantas isolado com papel filtro



Figura 4 – Condução do experimento de *C. includens* em plantas de soja

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Colonização dos fungos entomopatogênicos e localização em plantas de soja

Os três fungos entomopatogênicos testados, dos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria*, foram detectados nas diferentes partes das plantas de soja (*Glycine max.*). No entanto, observou-se diferenças notáveis entre as porcentagens de recuperação de cada espécie, em relação à localização na planta onde foi

encontrado, e ainda, em relação ao tempo desprendido para alcançar tal região (Tabela 2).

O isolado *I. fumosorosea* ESALQ-3422 foi o que apresentou o maior tempo para se translocar pela planta e com ocorrência restrita apenas aos caules e raízes das plantas, não sendo encontrada nas folhas. Essa espécie não foi registrada no interior da planta no período de até 7 dias após a inoculação, podendo ser observada apenas a partir dos 20 dias após a semeadura, em frequência de 17% na região do caule. Embora ao final de 35 dias após a inoculação, o fungo pode ser observado em elevada frequência (83%) na região radicular das plantas, a maior frequência registrada para a região radicular neste experimento, o fungo não foi observado na parte aérea da planta. Tal registro pode ser indício de que o fungo apresenta um deslocamento limitado através da planta, se concentrando na região a qual foi inoculado.

O isolado *Metarhizium* sp. indet. 1 ESALQ-1638 se apresentou como uma espécie de maior movimentação pelos tecidos vegetais da soja, podendo ser encontrado na raiz, caule e folhas aos 35 dias após a inoculação. A maior frequência foi observada em raízes (33%) no período de até 7 dias após a semeadura, o que demonstra uma aptidão à rápida dominância da rizosfera. No entanto, embora ter demonstrado rápida translocação dentre as raízes durante a primeira semana, o fungo só ocorreu nas partes aéreas a partir do trigésimo quinto dia. A maior frequência da espécie (50%) foi registrada no caule, a partir dos 35 dias após a inoculação, além disso, o fungo foi capaz de alcançar a região superior da planta no mesmo período. Isso demonstra que, apesar do fungo ter sido encontrado apenas nas raízes até os 20 dias após a semeadura, o mesmo é capaz de atingir o ápice da planta 35 dias após a inoculação via solo na semeadura. Por fim, o fungo demonstrou colonizar as raízes de forma consistente, registrando frequência nas 3 avaliações ao longo do tempo.

O isolado *B. bassiana* ESALQ-3399, foi o que se demonstrou mais regular em relação à distribuição pela planta no decorrer do tempo, colonizando primeiramente as raízes, seguido por caule, e finalmente alcançando as folhas no último período avaliado. O fungo também foi o que alcançou maiores frequências nas folhas, registrando presença de 83% em plantas com 35 dias após a inoculação.

Adicionalmente, o fungo foi o de maior frequência nas raízes no último período avaliado, no entanto, demonstrando certa inconsistência ao não ser registrado aos 20 dias após a inoculação.

Desta forma, os testes de colonização e localização dos fungos entomopatogênicos em plantas de soja demonstraram que os fungos estudados foram capazes de manter relações endofíticas com a planta, podendo colonizar tecidos das partes aéreas mesmo quando inoculados via solo na semeadura. Ainda, não foi verificada a presença destes fungos nas plantas controle.

Tabela 2 – Frequência e localização da presença dos fungos em diferentes tempos após a inoculação

| Tratamentos | Parte da planta | <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-3422 | | | <i>Metarhizium sp. Indet.</i> 1 ESALQ-1638 | | | <i>Beauveria bassiana</i> ESALQ-3399 | | |
|------------------------|-----------------|---|-------|-------|---|-------|-------|---|-------|-------|
| | | Raíz | Caule | Folha | Raíz | Caule | Folha | Raíz | Caule | Folha |
| | 7 | 0% | 0% | 0% | 33% | 0% | 0% | 17% | 0% | 0% |
| Dias após a inoculação | 20 | 0% | 17% | 0% | 33% | 0% | 0% | 0% | 17% | 0% |
| | 35 | 83% | 33% | 0% | 17% | 50% | 33% | 67% | 0% | 83% |

4.2 Consumo foliar e ganho de peso de lagartas *C. includens* e *H. armigera* utilizando discos de folhas

Diante a confirmação das relações endofíticas entre os fungos entomopatogênicos e plantas de soja, buscou-se avaliar possíveis efeitos em insetos-pragas. O consumo foliar médio por lagartas da espécie *C. includens* foi relativamente superior ao de *H. armigera*, resultado já esperado. Batista, Hirose e Silva (2015), demonstraram que à temperatura de 25°C, as lagartas de *H. armigera* consumiram uma média diária de 4,7 cm², durante o desenvolvimento de segundo instar à fase de pupa, enquanto Hoffmann-Campo et al. (2000), citam que até atingir a fase de pupa, lagartas de *C. includens* podem consumir valores médios diários de até aproximadamente 13 cm². No experimento conduzido no presente trabalho, lagartas de *H. armigera* consumiram uma média diária de pouco mais de 4 cm², valor inferior à consumida por *C. includens*, que foi de aproximadamente 6,3 cm²/dia.

Considerando as lagartas da espécie *C. includens*, o maior consumo foliar ocorreu em plantas inoculadas com o fungo *B. bassiana* ESALQ-3399 (Tabela 3). O tratamento foi o único a apresentar diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey à 95% de confiança) do tratamento controle, registrando um consumo superior em 5,18 cm², em relação ao controle. Nos demais tratamentos, envolvendo os fungos *I. fumosorosea* ESALQ-3422 e *Metarhizium sp. indet. 1* ESALQ-1638, também foram registrados valores superiores ao controle, no entanto, não foram suficientes para representar diferença estatística.

O mesmo comportamento não foi observado com as lagartas de *H. armigera*, em que não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 5). A diferença numérica, entre o maior consumo, de 9,24 cm² em plantas inoculadas com *Metarhizium*, e o menor (6,57 cm² no tratamento com *Isaria*), foi de apenas 2,67 cm². Desta forma, não foram notadas diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 3 – Consumo foliar (cm²) das lagartas *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera* durante 48h alimentadas em discos de folhas de plantas inoculadas com fungos entomopatogênicos.

| Tratamento | Consumo foliar (cm ²) | |
|--|-----------------------------------|-----------------------------|
| | <i>Chrysodeixis includens</i> | <i>Helicoverpa armigera</i> |
| Controle | 9,87 ± 1,55 B | 8,23 ± 1,15 A |
| <i>Metarhizium sp. indet. 1</i> ESALQ-1638 | 11,67 ± 1,31 AB | 9,24 ± 0,99 A |
| <i>Beauveria bassiana</i> ESALQ-3399 | 15,05 ± 0,77 A | 8,11 ± 0,89 A |
| <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-3422 | 13,97 ± 1,06 AB | 6,57 ± 1,11 A |

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

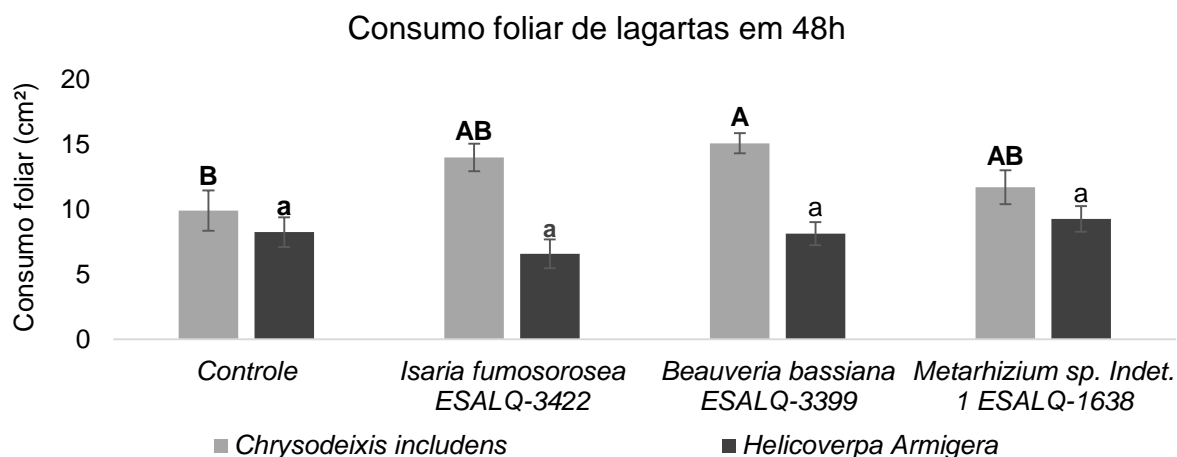


Figura 5 – Gráfico do consumo foliar em 48h pelas espécies *C. includens* e *H. armigera* alimentadas

em discos de folhas das plantas tratadas e diferenças estatísticas segundo teste de Tukey com 95% de confiança. Médias seguidas pela mesma letra para cada espécie de lagarta não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os ganhos de peso das lagartas alimentadas em discos foliares foram condizentes ao observado no consumo de área foliar. As lagartas de *C. includens* apresentaram maiores ganhos em peso, em relação às de *H. armigera*. Para *C. includens*, dois tratamentos foram significativamente diferentes em relação ao tratamento controle (Figura 6). Ao final de 48h, as lagartas alimentadas em discos de plantas inoculadas com os fungos *B. bassiana* ESALQ-3399 e *I. fumosorosea* ESALQ-3422 atingiram o peso de 42,82 e 46,64 mg, respectivamente. Quando comparadas com o controle negativo, os valores ganhos por estas lagartas foram maiores que o dobro apresentado pelas alimentadas em discos de plantas sem a inoculação de fungos entomopatogênicos (Tabela 4). Adicionalmente, pode-se observar uma associação entre o consumo foliar e o ganho em peso, nas lagartas alimentadas em plantas de soja inoculadas com *B. bassiana*. Para os dois critérios avaliados, o tratamento foi significativamente maior que o controle. Esta associação indica que o fungo entomopatogênico promoveu alterações na composição das folhas das plantas, em que a alimentação e o peso das lagartas foram maiores do que em discos de folhas de plantas não inoculadas.

Já para a espécie *H. armigera*, não foi possível detectar diferenças significativas entre os tratamentos, muito embora os valores numéricos tenham sido maiores nas plantas inoculadas com os fungos entomopatogênicos. Desta forma, a espécie *H. armigera* mostrou-se menos sensível do que a *Chrysodeixis includens* à inoculação de fungos entomopatogênicos na planta hospedeira (soja), considerando os parâmetros avaliados.

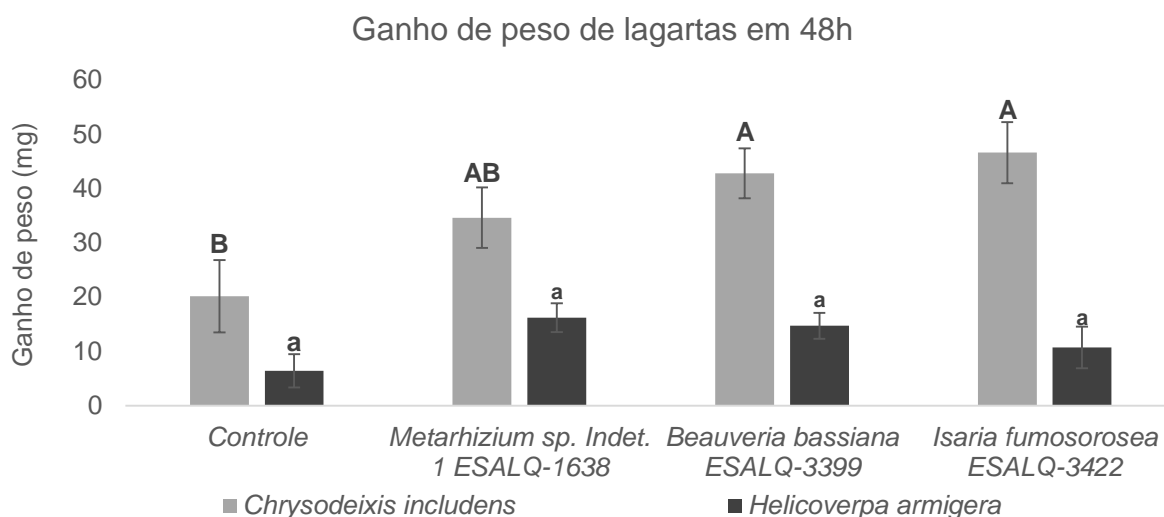


Figura 6 – Gráfico do ganho de peso de lagartas em 48h registrado pelas espécies *C. includens* e *H. armigera* alimentadas em discos de folhas das plantas inoculadas com fungos entomopatogênicos. Médias seguidas pela mesma letra para cada espécie de lagarta não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4 – Ganho de peso das lagartas *C. includens* e *H. armigera* após 48h alimentadas em discos de folhas de plantas inoculadas com fungos entomopatogênicos.

| Tratamento | Peso ganho (mg) | |
|--|-------------------------------|-----------------------------|
| | <i>Chrysodeixis includens</i> | <i>Helicoverpa armigera</i> |
| Controle | 20,13 ± 6,67 B | 6,39 ± 3,08 a |
| <i>Metarhizium sp. indet.</i> 1 ESALQ-1638 | 34,63 ± 5,56 AB | 16,21 ± 2,67 a |
| <i>Beauveria bassiana</i> ESALQ-3399 | 42,82 ± 4,61 A | 14,71 ± 2,38 a |
| <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-3422 | 46,64 ± 5,63 A | 10,71 ± 3,86 a |

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3 Ganho de peso de lagartas *C. includens* alimentadas diretamente em plantas de soja

Diante os resultados observados na diferença de consumo das lagartas de *C. includens*, investigou-se o ganho de peso das lagartas alimentadas diretamente em plantas de soja inoculadas pelos fungos entomopatogênicos (Figura 7).

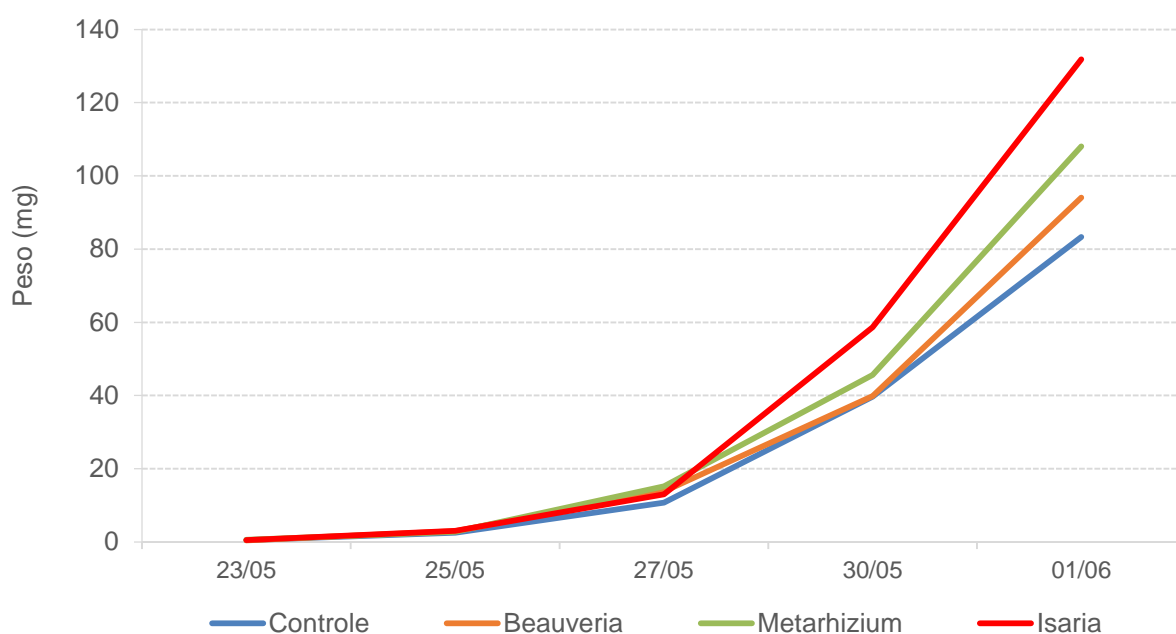


Figura 7 – Gráfico da evolução no tempo do peso (mg) de lagartas *C. includens* nos diferentes tratamentos.

Os resultados obtidos, no entanto, não apresentaram diferenças estatísticas (teste de Tukey com 95% de confiança), apesar dos maiores valores numéricos encontrados nos tratamentos com fungos (Tabela 5). Os valores numéricos dos pesos finais atingidos pelas lagartas foram maiores nos tratamentos, em ordem crescente: Controle (83,31 mg), *Metarhizium* (94,03 mg), *Beauveria* (108,05 mg) e *Isaria* (131,88mg).

Tabela 5 – Pesos iniciais e finais (mg) de lagartas *C. includens* mantidas em plantas inoculadas com fungos entomopatogênicos.

| Tratamento | Peso (mg) | |
|---|---------------------------|----------------------------------|
| | Peso Inicial ¹ | Ganho de peso total ² |
| Controle | 0,5 | 82,83 ± 6,59 A |
| <i>Metarhizium sp. Indet. 1</i> ESALQ-1638 | 0,5 | 93,59 ± 10,01 A |
| <i>Beauveria bassiana</i> ESALQ-3399 | 0,6 | 107,49 ± 12,68 A |
| <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-3422 | 0,5 | 131,36 ± 13,99 A |

⁽¹⁾ Peso inicial médio das lagartas.

⁽²⁾ Peso ganho em relação ao peso inicial.

No início deste experimento, foi confirmada a colonização e localização dos fungos entomopatogênicos nas plantas de soja após 20 dias da inoculação dos tratamentos (Tabela 6). Os resultados obtidos indicaram que, mesmo sendo possível a recuperação dos fungos nos tecidos das plantas, a presença dos fungos não resultou em diferenças significativas nos pesos das lagartas, diferentemente do observado no experimento anterior em discos de folha, em que foram registrados maiores pesos nos tratamentos com *Beauveria* e *Isaria*.

Tabela 6 – Frequência e localização dos fungos inoculados nas plantas utilizadas no experimento de *C. includens* em plantas de soja

| Tratamentos | <i>I. fumosorosea</i> ESALQ-3422 | | | <i>Metarhizium sp.</i> <i>Indet. 1</i> ESALQ-1638 | | | <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i> ESALQ-3399 | | |
|---|-------------------------------------|-------|-------|---|-------|-------|---|-------|-------|
| | Raiz | Caule | Folha | Raiz | Caule | Folha | Raiz | Caule | Folha |
| Início do experimento (20 Dias após a inoculação) | 17% | 0% | 0% | 0% | 33% | 17% | 83% | 17% | 50% |

5 CONCLUSÕES

Os isolados de fungos entomopatogênicos testados neste estudo, *Isaria fumosorosea* ESALQ-3422, *Metarhizium* sp. Indeterminada 1 ESALQ-1638 e *Beauveria bassiana* ESALQ-3399, foram capazes de colonizar endofiticamente plantas de soja quando inoculados via solo simultaneamente à semeadura das sementes. Não foi observado diferenças no consumo foliar e ganho de peso de lagartas de *Helicoverpa armigera*, alimentadas em discos foliares de plantas inoculadas com os mesmos fungos entomopatogênicos. Foram observados maiores consumos foliar de *C. includens* em plantas inoculadas com *B. bassiana* e maiores ganhos em peso das lagartas alimentadas em discos de plantas inoculadas com *B. bassiana* e *I. fumosorosea* em relação às plantas não inoculadas. Entretanto quando lagartas de *C. includens*, quando alimentadas diretamente nas plantas de soja inoculadas com fungos entomopatogênicos, não apresentaram diferenças significativas, analisando o parâmetro ganho de peso, em relação ao controle.

A maioria dos estudos sobre a inoculação de fungos entomopatogênicos em plantas e os efeitos em insetos pragas têm revelado que esta associação apresenta efeitos negativos subletais nas pragas. Embora os resultados deste estudos não sejam conclusivos há indícios de que a inoculação de *I. fumosorosea* e *B. bassiana* em soja possa resultar em condições mais adequadas para o desenvolvimento de *C. includens*. Assim, devido à alta complexidade envolvendo as interações endofíticas entre fungos entomopatogênicos e as plantas de soja e ao número limitado de estudos analisando estas interações, recomenda-se a repetição deste estudo bem como outros estudos abordando as relações multitróficas entre fungos entomopatogênicos, plantas hospedeiras e efeitos em insetos-pragas, tendo em vista o alto potencial benéfico destas relações aos manejos integrados e sustentáveis de pragas.

REFERÊNCIAS

ALICEWEB. Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em: <<http://aliceweb.mdic.gov.br//consulta-ncm/consultar>>. Acesso em: 8 de junho de 2016.

ALVES, S.B. 1998. **Controle microbiano de insetos**. 2^o Edição, FEALQ, 1163 p.

ÁVILA, C.; VIVAN, L.; VITAL TOMQUELSK, G. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. EMBRAPA. Disponível em: <[http://www.cnpso.embrapa.br/caravana/pdfs/FINAL_Circular_Tecnica_23_CPAO\(1\).pdf](http://www.cnpso.embrapa.br/caravana/pdfs/FINAL_Circular_Tecnica_23_CPAO(1).pdf)>. Acesso em: 18 de junho de 2016.

AZEVEDO, J.; ARAÚJO, W.; MACCHERONI Jr., W. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Azevedo_ImportanciaMicrorganismosEndofiticos_000fdraeloc02wx5eo0a2ndxy9sikmvf.pdf>. Acesso em: 20 de junho de 2016.

BATISTA, A. S.; HIROSE, E.; SILVA, M. S. Desenvolvimento da lagarta *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de soja. CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 7, MERCOSOJA, 2015, Florianópolis. Tecnologia e mercado global: perspectivas para soja: anais. Londrina: Embrapa Soja, 2015.

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

BEHIE, S.W. e BIDOCHKA, M.J. 2013. Insects as a Nitrogen Source for Plants. **Insects**, 4: 413-424.

BEHIE, S.W. e BIDOCHKA, M.J. 2014. Nutrient transfer in plant–fungal symbioses. **Trends in Plant Science**, 19: (11): 734–740.

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

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

BERNARDI, O. **Avaliação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON 87701 x MON 89788 no Brasil.** 2012. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-25042012-153518/>>. Acesso em 15 de junho de 2016.

BILLS, G.F. e POLISHOOK, J.D. 1991. Microfungi from *Carpinus caroliniana*. **Canadian Journal of Botany**, 69, 1477–1482.

BRUCE, W.L. e LEWIS, L.C. 2000. Colonization of Corn, *Zea mays*, by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, 66: 3468–3473.

BRUCK, D.J. 2005. Ecology of *Metarhizium anisopliae* in soilless potting media and the rhizosphere: Implication for pest management. **Biological Control**, 32: 155- 163.

BRUCK, D.J. 2010. Fungal entomopathogens in the rhizosphere. **Biological Control**, 55: 103-112.

CEPEA. **Custos de Produção Agrícola.** Piracicaba: CEPEA, 2014. 7p. Projeto Ativos do Campo – Grãos, Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA). Disponível em: <<http://cepea.esalq.usp.br/soja/?page=661>>. Acesso em: 13 de junho de 2016.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C.; VIVAN, L. M.; GUIMARÃES, H. O; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. Pesquisa Agropecuária Tropical. Goiânia, v. 43, n. 1, p. 110-113, Mar. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-40632013000100015&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 18 de junho de 2016.

EMBRAPA. *Helicoverpa armigera*. Embrapa soja – CNPSO. EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/helicoverpa/entendendo.html>>. Acesso em: 18 de junho de 2016.

EMBRAPA. Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil. 2004. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/manejoi.htm>>. Acesso em: 15 de junho de 2016.

FANG, W.G. e St. LEGER, R.J. 2010. Mrt, a gene unique to fungi, encodes an oligosaccharide transporter and facilitates rhizosphere competency in *Metarhizium robertsii*. **Plant Physiology**, 154: 1549-1557.

HAJEK, A.E. 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. **Adv. Microb. Ecol.** 15, 193–249.

HAJEK, A.E. e St. LEGER, R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**, 39: 293-322.

HESKETH, H.; ROY, H.E.; EILENBERG, J.; PELL, J.K.; HAILS, R.S. 2010. Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. **BioControl**, 55: 55–73.

HOFFMANN-CAMPO, C.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B.; OLIVEIRA, L.; SOSA-GÓMEZ, D.; PANIZZI, A.; CORSO, I.; GAZZONI, D.; OLIVEIRA, E. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/circtec30_000g46xpyyv02wx5o k0iuqaqkbbpq943.pdf>. Acesso em: 17 de junho de 2016.

HU, G. & St. LEGER, J. 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. **Applied and Environmental Microbiology**, 68 (12): 6383-6387.

INGLIS, G.D., GOETTEL, M.S., BUTT, T.M., STRASSER, H. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.). **Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential**. CABI Publishing, pp. 23–69.

JARONSKY, S.T. 2007. Soil ecology of the entomopathogenic Ascomycetes: A critical examination of what we (think) we know. In: Ekesi S. and Maniania, N. K (Eds). Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management. Research Signpost, Kerala India, pp. 91-144.

KHAN, A.L.; HAMAYUN, M; KHAN, S.A., KANG, S.; SHINWARI, Z.K.; KAMRAN, M.; REHMAN, S.; KIM, J.; LEE, I. 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.

MEDO, J. e CAGAN, L. 2011. Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. **Biological Control**, 59: 200-208.

MEYLING, N.V. e EILENBERG, J. 2006. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 113: 336–341.

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

MOSCARDI, F.; BUENO, A.; SOSA-GÓMEZ, D.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C.; POMARI, A.; CORSO, I.; YANO, S. Artrópodes que atacam as folhas da soja. EMBRAPA. 2013. Disponível em:

<<http://www.cnpso.embrapa.br/artropodes/Capitulo4.pdf>>. Acesso em 16 de junho de 2016.

OLIVEIRA, D.G.P.; PAULI, G.; MASCARIN, G.M.; DELALIBERA, I. 2015. A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. **Journal of Microbiological Methods**, v. 119, p. 44-52.

OWNLEY, B.H.; GRIFFIN, M.R.; KLINGEMAN, W.E.; GWINN, K.D.; MOULTON, J.K.; PEREIRA, R.M. 2008. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. **Journal of Invertebrate Pathology**, 98: 267–270.

PARSA, S.; ORTIZ, V.; VEGA, F.E. 2013. Establishing Fungal Entomopathogens as Endophytes: Towards Endophytic Biological Control. **Journal of Visualized Experiments**, 74: 503-560.

POLLI, A.; NEVES, A. F.; GALO, F. R.; GAZARINI, J.; RHODEN, S. A; PAMPHILE, J. A. Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. SaBios-Revista de Saúde e Biologia, [S.l.], v. 7, n. 2, set. 2012. ISSN 1980-0002. Disponível em: <<http://revista.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/view/1230>>. Acesso em: 19 de junho de 2016.

REICHERT, J. e COSTA, E. Avaliação de desfolhamentos contínuos e sequenciais, simulando dano de pragas em soja sobre o cultivar BRS 66'. Disponível em: <http://www.fepagro.rs.gov.br/upload/1398803610_art_03.pdf>. Acesso em: 17 de junho de 2016.

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

SOSA-GÓMEZ, D.R.; DELPIN, K.E.; MOSCARDI, F.; FARIAS J.R.B. 2001. Natural Occurrence of the Entomopathogenic Fungi *Metarhizium*, *Beauveria* and *Paecilomyces* in Soybean Under Till and No-til Cultivation Systems. **Neotropical Entomology**, 30(3): 407-410.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; DELPIN, K.E.; MOSCARDI, F.; NOZAKI M. 2003. The Impact of Fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson Epizootics and on Populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: *Noctuidae*), on Soybean. **Neotropical Entomology**, 32(2):287-291.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; MOSCARDI, F. 1994. Effect of till and no-till soybean cultivation on dynamics of entomopathogenic fungi in the soil. **Florida Entomologist**, 77:284-287.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; MOSCARDI, F. 1998. Laboratory and field studies on the infection of stink bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii* and *Euschistus heros*

(Hemiptera: *Pentatomidae*) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, 71:115-120.

St. Leger, R.J. 2008. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, 98 (3): 271-276.

TEFERA, T. e VIDAL, S. 2009. Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **BioControl**, 54:663–669.

USDA. PSD Online - Production, Supply, and Distribution Online Database. United States Department of Agriculture. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Acesso em 8 de junho de 2016.

VEGA, F.E. 2008. Insect pathology and fungal endophytes. **Journal of Invertebrate Pathology**, 98: 277-279, 2008.

VEGA, F.E. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, 2:149–159.

WYREBEK, M.; HUBER, C.; SASAN R.K.; BIDOCHKA, M.J. 2011. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. **Microbiology-SGM**, 157: 2904-2911.