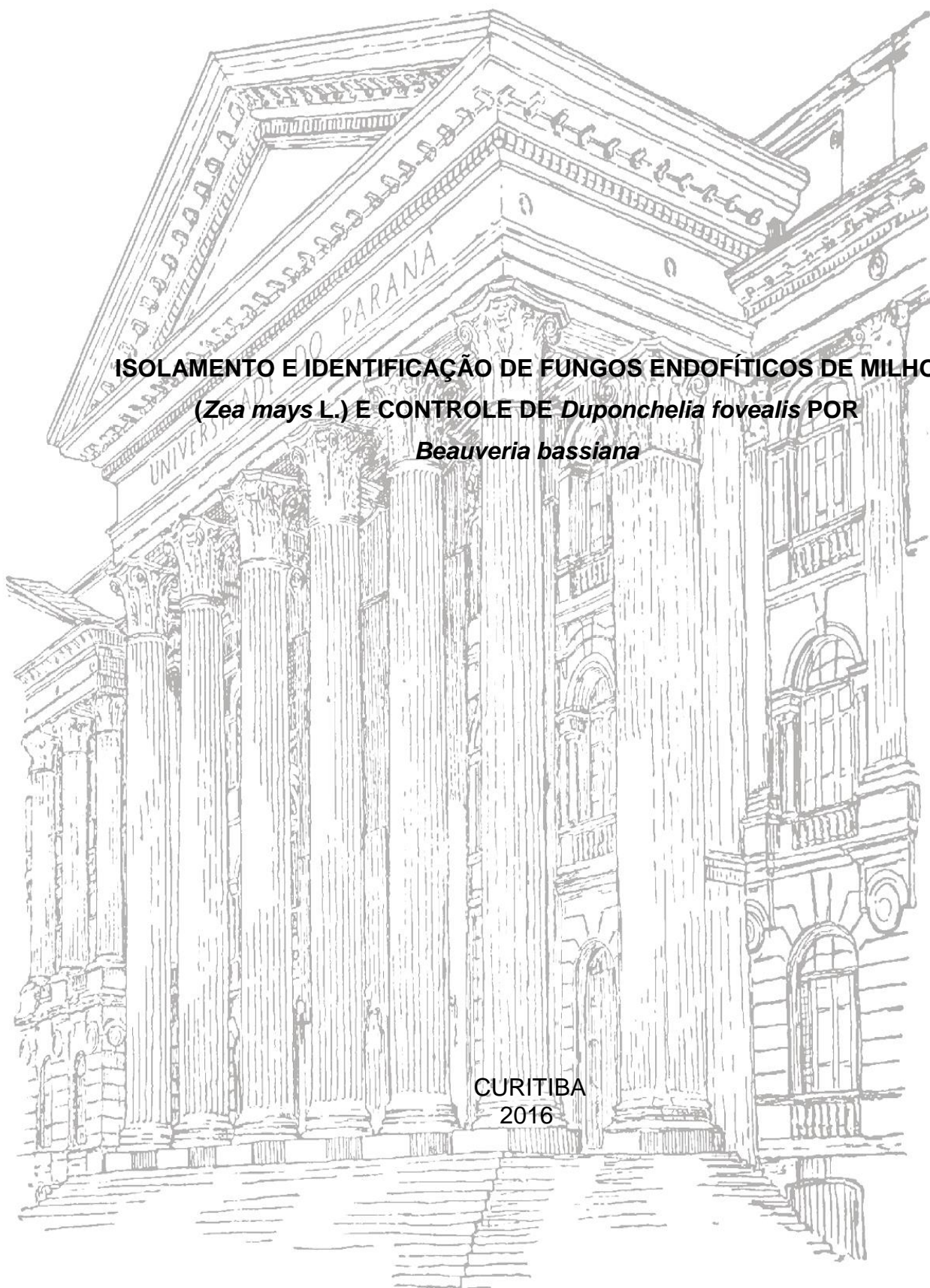


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATASHA DA SILVA MIRANDA GUILHERME

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE MILHO
(*Zea mays* L.) E CONTROLE DE *Duponchelia fovealis* POR
*Beauveria bassiana***

CURITIBA
2016



NATASHA DA SILVA MIRANDA GUILHERME

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE MILHO
(*Zea mays* L.) E CONTROLE DE *Duponchelia fovealis* POR
*Beauveria bassiana***

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patricia Dalzoto

CURITIBA
2016

TERMO DE APROVAÇÃO

NATASHA DA SILVA MIRANDA GUILHERME

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* L.) E CONTROLE BIOLÓGICO DE *Duponchelia fovealis* PELO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana*

Monografia aprovada como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel, Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Patrícia do Rocio Dalzoto
Orientadora - Departamento de Patologia Básica - UFPR

Prof. Ida Chapaval Pimentel
Departamento de Patologia Básica - UFPR

Dr. Alex Poltronieri
Departamento de Patologia Básica - UFPR

Curitiba, 21 de dezembro 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pela saúde e disposição que me permitiu a realização deste trabalho.

À Dra Patrícia, minha Orientadora, pelo apoio contínuo e paciente, e sempre responder quando mando uma mensagem.

Ao Dr Alex, por me ajudar imensamente com o bioensaio e dicas para que o experimento desse certo.

Às estagiárias da Professora Patrícia, Mariana Nichele e Luana Goossen, que estiveram comigo ao longo do experimento compartilhando as dificuldades.

Aos amigos do LabMicro, que me aturaram fazendo mil perguntas sobre a rotina do laboratório.

Ao meu esposo pela compreensão em momentos de estresse.

Aos meus pais, Jorge Luiz e Iereci, por estarem sempre ao meu lado.

Aos amigos e colegas da graduação.

Agradeço também a todos que uma alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

**“Conseguimos realizar nossos propósitos,
economizando os minutos.”**

Charles Darwin

RESUMO

O milho é uma das mais importantes plantas do setor agrícola da atualidade e os fungos endofíticos/entomopatogênicos podem apresentar atividade capaz de proteger a planta de organismos nocivos. Assim, o presente projeto teve como objetivo inicial isolar fungos entomopatogênicos como endofíticos em plantas de milho. Um segundo objetivo, dependente do primeiro, foi realizar bioensaios utilizando entomopatógenos contra uma praga do morangueiro, *Duponchelia fovealis*. Foi realizado isolamento (PIMENTEL, 2001) onde duas folhas de dez diferentes plantas foram superficialmente desinfetadas e cortadas em fragmentos de 1 cm². Para cada folha, foram selecionados 12 fragmentos, depositados em 3 placas de Petri, contendo meio Agar Sabouraud (4 fragmentos por placa, 3 repetições) acrescido do antibiótico estreptomicina (100 µg/mL), e incubou-se a 28 ± 0,5°C, por sete dias. As placas foram monitoradas diariamente e foram obtidos 241 isolados, os quais foram separados em 39 morfogrupos. A frequência de infecção foi de 100%. Em seguida, por microcultivo, foram identificados os seguintes gêneros fúngicos: *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Epicoccum* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Alternaria* sp., *Blastomyces* sp., *Sporotrichum* sp., *Fusarium* sp. e *Acremonium* sp. Como dentre os isolados não foram encontrados entomopatógenos conhecidos, foi utilizada a linhagem Bb CG 25, do fungo *Beauveria bassiana* da coleção biológica do LabMicro-DPAT, que é um agente de controle biológico amplamente utilizado contra importantes insetos praga de diferentes culturas, no Brasil e no mundo. O bioensaio consistiu na exposição de 10 lagartas de *Duponchelia fovealis* de 3^o instar a três tratamentos (T1 - solução salina 0,9%, T2 - BbCG25; T3 - Bovemax - produto comercial a base de *B. bassiana*), com 4 repetições. Observou-se que a maior taxa de mortalidade dos insetos acontece no tratamento com o inseticida biológico comercial, Bovemax (formulação a base de *Beauveria bassiana*). O tratamento com a linhagem Bb CG 25 de *B. bassiana* não foi estatisticamente diferente do tratamento com solução salina 0,9%. Este trabalho pretende contribuir com informações sobre a microbiota fúngica endofítica de milho e investigar a eficácia dos fungos entomopatogênicos, para sua eventual manipulação e utilização no controle de insetos pragas em importantes culturas, como o milho e o morangueiro.

Palavras-chave: fungos endofíticos; entomopatógenos; *Beauveria bassiana*;

ABSTRACT

Corn is currently one of the most important plants in the agricultural sector and its endophytic/entomopathogenic fungi may present an activity capable of protecting the plant from harmful organisms. Therefore, the project's initial objective was to isolate entomopathogenic and endophytic fungi in corn plants. A second objective, dependent on the first one, was to perform bioassays using entomopathogens against a strawberry plague, *Duponchelia fovealis*. It was performed an isolation (PIMENTEL, 2001) where two leaves of ten different plants were superficially disinfected and cut into fragments of 1 cm². For each leaf, it was selected 12 fragments, deposited in 3 Petri dishes containing Sabouraud Agar media (4 fragments per dish, 3 replicates) plus the antibiotic streptomycin (100 µg / mL), and incubated at 28 ± 0.5 ° C for seven days. The Petri dishes were daily monitored and 241 isolates were obtained, which were separated into 39 morphogroups. The frequency of infection was 100%. Then, through microculture, the following fungal genera were identified: *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Epicoccum* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Alternaria* sp., *Blastomyces* sp., *Sporotrichum* sp., *Fusarium* sp. and *Acremonium* sp. Since no known entomopathogens were found among the isolates, the Bb CG 25 strain of the *Beauveria bassiana* fungus from the biological collection of LabMicro-DPAT was used, which is a biological control agent widely used against important pest insects of different cultures in Brazil and in the world. The bioassay consisted of the exposition of 10 caterpillars of *Duponchelia fovealis* of 3rd instar to three treatments (T1 - saline solution 0.9%, T2 - BbCG25; T3 - Bovemax - commercial product based on *B. bassiana*), with 4 replicates. The highest mortality rate of *Duponchelia fovealis* found was by using the commercial brand Bovemax (formulated from *Beauveria bassiana*). Treatment with the lineage Bb CG 25 from *B. bassiana* demonstrated similar statistical results as treatment using saline solution 0,9%. This work intends to contribute with information on the endophytic fungal microbiota of corn and to investigate the efficacy of entomopathogenic fungi for possible manipulation and use in the control of insect pests in important crops such as corn and strawberry.

Key-words: endophytic fungi; entomopathogen; *Beauveria bassiana*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVO.....	12
1.2 JUSTIFICATIVA.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 MILHO – IMPORTÂNCIA, PAUTAS ATUAIS NO BRASIL.....	14
2.2 INSETOS PRAGA DO MILHO.....	15
2.3 CONTROLE BIOLÓGICO.....	16
2.4 FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	18
2.5 FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS.....	19
2.6 <i>Beauveria bassiana</i>	21
2.7 MORANGUEIRO e <i>Duponchelia fovealis</i>	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	24
3.2. ISOLAMENTO.....	25
3.3 IDENTIFICAÇÃO CLÁSSICA.....	26
3.3.1 MACROMORFOLOGIA.....	26
3.3.2 MICROMORFOLOGIA.....	27
3.3.2.1 TÉCNICA DO MICROCULTIVO.....	27
3.4. BIOENSAIO.....	28
3.4.1. INSETOS UTILIZADOS.....	28
3.4.2. PRODUÇÃO DE ESPOROS.....	29
3.4.3 SELEÇÃO DOS FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS VIRULENTOS....	30
3.4.3.1 Experimento 1.....	31
3.4.3.2 Experimento 2.....	32
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE MILHO....	34
4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS.....	35
4.2.1. MACROMORFOLOGIA.....	35
4.2.2. MICROMORFOLOGIA.....	42

4.3. BIOENSAIO.....	49
5. CONCLUSÕES.....	54
6. REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

O milho constitui uma cultura de grande importância no Brasil, sendo utilizado na alimentação humana, especialmente em regiões de baixa renda como o Nordeste do Brasil, porém sua maior e principal utilização é na composição das rações de animais. Diante de suas diversas formas de utilização, tornou-se um dos mais importantes produtos do setor agrícola no Brasil, contribuindo em fatores sociais e econômicos.

Fungos endofíticos são encontrados em todas as plantas, já tendo sido extensivamente descritos em milho. Foram definidos, por Hallmann et al. (1997), como aqueles que podem ser isolados do interior de tecidos vegetais desinfectados superficialmente, e que não causam danos ao hospedeiro. Essa definição inclui relações neutras e simbióticas. Os fungos endofíticos são comumente associados às plantas. Eles vivem nos espaços intercelulares ou intracelulares dos tecidos das plantas durante todo ou parte de seu ciclo de vida, sem causar sintomas aparentes de doenças. Seu papel ainda é incerto, mas há relatos de que endófitos vivendo no interior destas plantas podem ser responsáveis por algum tipo de proteção contra insetos praga, por exemplo, ou ainda na produção de substâncias que beneficiam o crescimento vegetal. Alguns fungos entomopatogênicos já foram isolados de diferentes plantas como endófitos, e, por sua capacidade de parasitar e eliminar insetos, podem ser importantes agentes de controle biológico, minimizando o uso de pesticidas químicos nas culturas. Como por exemplo, o emprego, na região Nordeste, do fungo *Metarhizium anisopliae* para o controle da cigarrinha-da-folha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata*. O fungo *Beauveria bassiana* é empregado em escala comercial em alguns países, entre eles os Estados Unidos e o México. Volumes consideráveis desse fungo foram comercializados no Brasil para o controle de ácaros do mamão e da broca-do-café, além de um volume menor ter sido destinado ao controle de cochonilhas.

Este trabalho teve como objetivo inicial isolar fungos entomopatogênicos encontrados como endofíticos em folhas de milho, no intuito de caracterizá-los morfológicamente e identificá-lo ao nível de gênero. Encontrando isolados com

potencial para controle biológico de insetos, estes seriam testados em bioensaios, para que, futuramente pudessem ser empregados como controladores biológicos de pragas do milho. Entretanto, embora tenham sido isolados diversos gêneros de endófitos, não foram encontrados, no milho, fungos de importância para o controle biológico de insetos. Desta forma, pela disponibilidade imediata no laboratório de plantas de morangueiro e do fitopatógeno *Duponchelia fovealis*, praga desta cultura, optou-se por testar a eficiência de fungos entomopatogênicos contra este inseto, empregando a linhagem BbCG25 do fungo *Beauveria bassiana*, do banco biológico do LabMicro-DPAT-UFPR.

1.1 OBJETIVO

- **Objetivo geral**

O presente trabalho tem como objetivo isolar e caracterizar a microbiota endofítica fúngica de plantas do milho e avaliar o potencial destes fungos, e também de realizar o controle biológico de *Duponchelia fovealis* com a linhagem Bb CG 25 de *Beauveria bassiana*.

- **Objetivos específicos**

1. Isolar fungos endofíticos de plantas de milho;
2. Estimar a frequência de infecção nestas plantas;
3. Avaliar a incidência e diversidade de gêneros encontrados, com ênfase para os fungos entomopatogênicos;
4. Caracterizar os isolados por meio de macro e micromorfologia;
5. Realizar bioensaios utilizando linhagens de *Beauveria bassiana* contra lagartas de *Duponchelia fovealis*, testando sua eficiência para o uso no controle biológico destes insetos.

1.2 JUSTIFICATIVA

O princípio básico do controle biológico é limitar as pragas agrícolas e os insetos transmissores de doenças a partir do uso de seus inimigos naturais, que podem ser outros insetos benéficos, predadores, parasitas, e microrganismos, como fungos, vírus e bactérias. Tem como objetivo utilizar esses inimigos naturais que não deixam resíduos nos alimentos e são inofensivos ao meio ambiente e à saúde da população.

Sendo assim, torna-se eficaz a redução do uso de pesticidas químicos empregados no manejo integrado de pragas, proporcionando melhoria da qualidade dos produtos agrícolas, redução da poluição ambiental e preservação dos recursos naturais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Milho – importância, pautas atuais no Brasil

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China, respectivamente. Dos três países, somente aqui tem-se a possibilidade de uma segunda safra dentro de um mesmo ano-safra – sendo que atualmente esta última já é responsável por mais da metade do total de milho produzido. No que se refere ao comércio exterior, em relação à média dos últimos cinco anos-safra, o Brasil foi o segundo maior exportador do grão, com 18% do mercado, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, que ficou com 36% do mercado. Para se ter ideia de como o mercado é concentrado, os quatro primeiros países exportadores, respectivamente Estados Unidos, Brasil, Argentina e Ucrânia foram responsáveis por cerca de 83% do mercado mundial (CONAB, 2016).

O milho é um dos mais importantes produtos no conjunto da agricultura brasileira, uma vez que é produzido em praticamente todas as grandes regiões, e representa cerca de 40% do atual volume produzido de grãos e 28% da área plantada. O cereal é o mais forte insumo do setor de criação animal – principalmente na alimentação de aves e suínos –, sobressaindo-se também na alimentação humana, sob a forma de seus derivados: fubá, farinha, óleo, amido etc. No que se refere ao destino da produção de milho no Brasil, na média dos últimos cinco anos, 59% são voltados à alimentação animal, com a avicultura representando 34%, a suinocultura 13% e a bovinocultura 7%. Já o consumo industrial corresponde a cerca de 7,5% da produção total, as exportações, a 28% e o consumo humano, a 3%. A parcela restante é direcionada a outros setores. (CONAB, 2016)

O estudo das projeções de produção do cereal, realizado pela Assessoria de Gestão Estratégica do Mapa, indica aumento de 19,11 milhões de toneladas entre a safra de 2008/2009 e 2019/2020. Em 2019/2020, a

produção deverá ficar em 70,12 milhões de toneladas e o consumo em 56,20 milhões de toneladas. Esses resultados indicam que o Brasil deverá fazer ajustes no seu quadro de suprimentos para garantir o abastecimento do mercado interno e obter excedente para exportação, estimado em 12,6 milhões de toneladas em 2019/2020. Número que poderá chegar a 19,2 milhões de toneladas. (MAPA, 2016).

O milho representa uma das maiores culturas de grãos no país e o estado do Paraná é responsável pela segunda maior quantia produzida. Apesar das condições climáticas adversas com longo período de estiagem e agora fortes pancadas de chuva, os produtores rurais do Sudoeste do Paraná já semearam até cerca de 140 mil dos 310 mil hectares que devem ser cultivados com soja na safra 2016/2017, o que representa cerca de 45% do total da área nos 15 municípios do da microrregião de Pato Branco. Nestas lavouras foram plantados entre 15% a 20% da área com soja e, praticamente, a totalidade das lavouras com milho. O Deral projeta que nos 15 municípios a safra 2016/2017 deve superar 1,05 milhões de toneladas, praticamente a mesma produção da safra anterior de 1,03 milhões. Neste ano a área com soja teve queda de 1% com cultivo de 310 mil hectares contra 311,7 mil da safra passada. A área com milho aumentou 17%, passando de 25,6 mil para 30 mil hectares. A região deve produzir 315 mil toneladas, 21% a mais que na safra anterior. (ABRAMILHO, 2016)

2.2 Insetos praga do milho

Insetos praga de diversas culturas são controlados por defensivos agrícolas, os quais podem trazer malefícios para o solo e água próximos à plantação, para quem os manuseia e até mesmo para o consumidor final, seja na alimentação humana ou animal.

São várias as espécies de insetos que se alimentam dos grãos de milho, porém o gorgulho ou caruncho, *Sitophilus zeamais* e a traça-dos-cereais, *Sitotroga cerearella*, são responsáveis pela maior parte das perdas. Embora ainda não seja encontrada no Brasil, devido aos grandes prejuízos que vem

causando ao milho armazenado, no México e em países da América Central e da América do Sul, bem como em alguns países africanos, deve-se prestar atenção à broca-grande-do-grão, *Prostephanus truncatus* a fim de evitar sua entrada no país. (SANTOS, 2006).

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, destaca-se como importante praga do milho, tanto pela redução da produtividade e da qualidade do produto final, quanto pela dificuldade de controle (TORRECILLAS, 2001).

As pragas independentes da cultura desenvolvem-se nas plantas cultivadas ou daninhas que precedem o milho. Algumas vezes, o milho não é o hospedeiro principal, mas devido à população presente na lavoura no momento da semeadura, podem ocorrer severos danos nas plântulas. Em geral, são pragas esporádicas, cuja ocorrência e intensidade dos danos podem ser previstas, pois estão presentes antes da instalação da lavoura do milho. Nesse grupo, destacam-se as formigas, a larva-mate, os cupins, os corós, a broca-do-azeven, a lagarta-elasma, o ligeirinho, a lagarta-da-aveia, a lagarta-da-rosca, os grilos, os percevejos e as cigarrinhas (GASSEN, 1996).

2.3 Controle biológico

Com a necessidade de proteger as culturas contra insetos pragas, os agrotóxicos passaram a ser usados em larga escala, muitas vezes de maneira incorreta. Este uso indiscriminado traz problemas principalmente devido à sua ação poluidora, aos resíduos deixados nos alimentos, à resistência de determinados insetos ao produto químico e à ação deste produto não apenas contra insetos prejudiciais, mas também contra insetos benéficos (VILAS-BOAS, 1991). Com a necessidade de reduzir o uso de inseticidas químicos tem-se procurado obter produtos eficientes no controle de pragas, principalmente por meio de microrganismos (VILAS-BOAS; PACCOLA-MEIRELLES; LUNA-ALVES-LIMA, 1992), de modo que um manejo integrado de pragas possa ser feito de forma segura.

Uma alternativa ao controle químico é o uso do controle biológico, que pode ser definido como a diminuição de uma população de pragas pela

utilização de predadores, parasitas ou patógenos (HAWKINS; CORNELL, 1999). O controle biológico de insetos não é uma técnica recente. Desde o séc III a.C., formigas predadoras eram utilizadas pelos chineses para controlar pragas em plantas cítricas. Na Arábia Medieval os agricultores transportavam colônias de formigas predadoras para o controle de formigas fitófagas em palmáceas (CARVALHO, 2006).

O uso de microrganismos como agentes de controle é uma forma de associação quem vem sendo uma realidade satisfatória na agricultura, enquanto no meio urbano, ainda se trata de algo que não foi completamente difundido, como na agricultura (LOPES, 2005). Aproximadamente 12% dos 479 produtos registrados para o controle de pragas na agricultura são produtos biológicos como por exemplo , *Trichoderma harzianum* para o controle do mofo-branco em feijão e *Telenomus remus* para controle de *Spodoptera frugiperda* (POMARI-FERNANDES et al., 2014). No mercado de domissanitários, trata-se de uma prática ainda não consolidada, tendo em vista que dos mais de 100 produtos registrados para o controle de pragas urbanas, apenas dois tem como princípio ativo os agentes biológicos *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* (ANVISA, 2014). Segundo Alles et al. (2010), essas duas espécies vêm sendo utilizadas há alguns anos no controle de larvas de mosquitos. Dessa forma, torna-se importante verificar a viabilidade do uso de agentes biológicos no controle de pragas urbanas. Uma alternativa seria o uso de fungos entomopatogênicos tendo em vista seu amplo uso e eficiência no controle de pragas agrícolas (LOPES, 2005). Os fungos entomopatogênicos, são aqueles que atuam como patógenos causadores de doenças em insetos e, conseqüentemente, na sua mortalidade (ORLANDELLI; PAMPHILE, 2011).

Desta forma, aumenta o interesse em utilizar estes microrganismos no controle biológico de pragas em práticas agrícolas. A importância deles para seus hospedeiros vegetais vem sendo relatada há algumas décadas. Em alguns casos foram encontradas interações endófito / planta que levam a um melhor desempenho destas (CLAY, 1987), como maior tolerância ao ataque de insetos (CLAY, 1987; CLEMENTE *et al.*, 1990; CARROLL, 1988; AZEVEDO *et al.*, 2000); resistência a doenças e parasitas (WHITE Jr.; COLE, 1985; CLARK;

MILLER; WHITNEY, 1989) resistência a nematódeos (WILSON; CLEMENTE; KAISER, 1991); antiherbivoria pela produção de toxinas (WHITE Jr.; COLE, 1985); aumento da tolerância de plantas à seca, enquanto outros promovem a fixação não-simbiótica de nitrogênio (AZEVEDO, 1998). A presença dos endofíticos no tecido vegetal pode ser evidenciada por análise microscópica ou por meio de isolamento em meios de cultivo.

No Brasil, o *B. bassiana* já é utilizado no controle de pragas de interesse agrônômico (TONET; REIS, 1979). Este entomopatógeno mostrou-se eficiente no controle do “bicudo do algodoeiro”, *Anthonomus grandis*, (SILVA, 2001). *B. bassiana* já foi isolado na “broca do café”, *Hypothenemus hampei*, no norte do Espírito Santo e seu uso no controle deste inseto também tem sido observado na Índia (HARAPRASAD et al., 2001). Também promove a morte de cupins *Nasutitermes* sp que atingem plantações de cana-de-açúcar, pela ação de micotoxinas ou abrasão da cutícula, causando a desidratação do inseto (MALAGODI; VEIGA, 1995). Ainda é utilizado no controle do percevejo do colmo do arroz *Tibraca limbativentris* (MARTINS; LIMA, 1994).

2.4 Fungos endofíticos

Fungos endofíticos são microrganismos que habitam o interior dos tecidos vegetais sem lhes causar doenças e, muitas vezes, trazendo benefícios. Petrini (1991) definiu o termo endofítico como sendo todos os microrganismos que habitam a parte aérea das plantas, sendo capazes de colonizar, em alguma fase de seu ciclo de vida, os tecidos internos dos vegetais, sem causar dano aparente. Os microrganismos endófitos influenciam na preferência e na performance de insetos herbívoros, demonstrando uma diminuição nos danos causados por fitófagos (OKI et al., 2009).

Os principais fungos encontrados em quatro espécies vegetais, incluindo o milho, podem ser visualizados na (TABELA 1), segundo Azevedo (1998):

TABELA 1: Fungos endofíticos mais frequentemente isolados de 4 espécies de plantas do estado de São Paulo (os números representam porcentagem de fragmentos analisados contendo fungo)

TAXON	STYLOSANTHES	BANANEIRA	MILHO	TANGERINAS
<i>Alternaria</i> sp.	1,4	0,08	0,0	0,0
<i>Aspergillus</i> sp.	0,0	0,08	1,0	0,0
<i>Cordana musa</i>	0,0	5,2	0,0	0,0
<i>Curvularia</i> sp.	0,0	0,4	0,03	0,0
<i>Deschlera</i> sp.	0,0	0,9	0,1	0,0
<i>Epicoccum purpuracens</i>	0,0	1,4	0,0	0,0
<i>Fusarium</i> sp.	0,0	0,6	6,3	0,0
<i>Glomorella cingulada</i>	15,4	5,8	0,3	0,0
<i>Glomerella</i> sp.	1,7	0,0	0,3	56,5
<i>Humicola</i> sp.	0,0	0,04	0,0	0,0
<i>Nigrospora oryzae</i>	1,07	2,6	0,01	0,0
<i>Nodulisporium</i> sp.	0,08	0,0	0,0	0,0
<i>Penicillium</i> spp.	0,0	0,0	1,0	0,0
<i>Periconia</i> sp.	0,9	0,2	0,01	0,0
<i>Phomopsis</i> sp.	0,3	0,3	0,04	0,0
<i>Phyloslicla</i> sp.	0,4	1,2	0,0	27,0
<i>Rhizopus</i> sp.	0,0	0,0	0,3	0,0
<i>S. poromiela minima</i>	1,1	1,0	0,0	0,0
<i>Syncephalastrum</i> sp.	0,0	0,0	0,03	0,0
<i>Trichoderma</i> sp.	0,0	0,04	1,8	0,0
<i>Xylaria</i> spp.	6,3	7,2	0,0	0,0
Outros	8,3	3,7	3,0	11,8

FONTE: Azevedo, 1998.

2.5 Fungos entomopatogênicos

Ao longo dos últimos 50 anos, aproximadamente, observou-se um otimismo crescente no emprego de fungos entomopatogênicos no controle biológico de pragas da agricultura, principalmente visando a eliminação ou diminuição dos pesticidas químicos (VEGA, 2008).

Os entomopatógenos vêm sendo estudados no Brasil há décadas, mas foi somente depois de 1964, com a ocorrência de *Metarhizium anisopliae* em cigarrinhas da cana-de-açúcar, que estes receberam maior atenção dos

pesquisadores. Dentre os principais fungos entomopatogênicos tem-se *Metarhizium* Sorokin, *Beauveria* Vuillemin, *Nomurea rileyi* (Farlow) Samson, *Vericillium lecanii* (Zimm.) Viègas, *Hirsutella thompsonii* Fisher, *Aspergillus* Michelli, *Paecylomyces* Bainier, *Fusarium* Link (Atraction), *Sporoporella uvella* (Krass.) Gd., *Tolypocladium* Gams, *Sporothrix* Hektoen e Perkins, entre outros (ALVES, 1998).

Esses microrganismos vêm ganhando destaque por representarem uma fonte potencial de novos compostos químicos e biológicos, podendo ser utilizados, não somente para resolver e auxiliar problemas de saúde humana, mas também para plantas e animais (STROBEL, 2003). Alguns, têm sido amplamente estudados devido à sua ação antimicrobiana. Contudo, a incidência desses e a frequência de infecção variam muito de acordo com a espécie hospedeira e a origem geográfica da mesma. Acredita-se que cada espécie vegetal possua microrganismos endofíticos associados e com propriedades ainda pouco conhecidas, mas que representem grande potencial biotecnológico (PAMPHILE; AZEVEDO, 2002; PIMENTEL, 2001).

Por mais de duas décadas acredita-se que as plantas podem usar seus inimigos naturais como predadores e parasitas como “guarda costas” contra herbivoria. Durante muito tempo, os fungos entomopatogênicos não foram considerados neste âmbito. O potencial de utilização de fungos entomopatogênicos endofíticos no controle de insetos pode levar a um biocontrole mais efetivo se estes fungos puderem ser inoculados artificialmente nas plantas, como algumas técnicas descritas por Latch e Christensen (1985) sugerem.

Vários entomopatógenos já foram isolados como endofíticos em diversas plantas. Estes podem ser encontrados naturalmente como endofíticos ou ainda ser introduzidos nas plantas de interesse de forma artificial, por uma variedade de técnicas. *Beauveria bassiana* foi isolado de *Zea mays* (milho) (VAKILI, 1990; BING; LEWIS, 1991; 1992; JONES, 1994, LOMER et al., 1997; CHERRY et al., 1999, 2004; WAGNER; LEWIS, 2000; LEWIS et al., 2001; ARNOLD, LEWIS, 2005), *Solanum tuberosum* (batata), *Gossypium hirsutum* (algodão) (JONES, 1994), *Lycopersicon esculentum* (tomate) (LECKIE, 2002;

OWNLEY et al, 2004), *Musa paradisiaca* (banana) (AKELLO et al., 2007), *Coffea arabica* (café) (POSADA; VEGA, 2007), *Theobroma cacao* (cacau) (POSADA; VEJA, 2005).

Isolados de *B. bassiana* podem ser inoculados artificialmente nas plantas por meio de pulverização nas folhas, imersão de raízes e sementes e pelo solo (PARSA et al., 2013). A colonização por *B. bassiana* já foi bem sucedida em tomate, algodão, milho, feijão, trigo, abóbora (GURULINGAPPA et al., 2010), banana (AKELLO et al., 2007), cacau (POSADA; VEGA, 2005), café (POSADA et al., 2007), juta (BISWAS et al., 2012), entre outros.

Alguns entomopatógenos endofíticos, a saber: *B. bassiana*, *Metharhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* e *Isaria (Paecilomyces)* são classificados como não-clavicipitáceos (RODRIGUEZ et al., 2009), e são transmitidos horizontalmente na planta. Estes fungos podem ser antagonistas dos patógenos vegetais e ainda promover o crescimento vegetal (OWNLEY et al., 2004, 2008; VEGA et al., 2009). *B. bassiana* como endófito de tomate e algodão é responsável pelo aumento da produção de sementes e da altura das plantas, a eliminar o patógeno *Rhizoctonia solani* (OWNLEY et al., 2004, 2008; GRIFFIN et al., 2005), o que pode ser devido ao antagonismo de *B. bassiana* contra *R. solani*, por competição ou simplesmente por induzir a resistência na planta (OWNLEY et al., 2008).

2.6 *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana foi descrito pela primeira vez por Bassi, em 1835, como causador da “moscardina”, uma doença que atingia os bichos-da-seda. Foi então denominado como *Botrytis bassiana*, por Giuseppe Balsamo Crivelli, em 1838, recebendo posteriormente vários outros nomes, como *Sporotrichum densum*, *Beauveria densa*, *Sporotrichum globuliferum*, *Beauveria globulifera* e *Beauveria bassiana*. O gênero *Beauveria*, propriamente dito, foi descrito em 1912 por Vuillemin. (AINSWORTH, 1956).

Beauveria é um gênero cosmopolita e é encontrado principalmente no solo e em insetos, sendo reconhecidamente entomopatogênico, parasitando

cerca de 750 espécies de insetos (URIBE, 2004) Estudos mais recentes relatam este gênero também como endofítico de uma variedade de plantas (VEGA, 2008).

Por vezes, a taxonomia de *Beauveria* gera dúvidas, principalmente por serem conhecidos organismos anamórficos (que não apresentam ciclo sexuado descrito) e, assim, classificados num grupo artificial denominado Mitospóricos (anteriormente conhecidos como filo Deuteromycota). Os representantes teleomórficos de *Beauveria*, por sua vez, são pertencentes ao filo Ascomycota, ordem Hypocreales, e incluem o gênero *Cordyceps* (LI, 2001).

Análises filogenéticas por meio das regiões espaçadoras internas do DNA ribossomal (ITS) e do fator de alongação 1-alfa (EF1-a) levaram à elucidação de 6 clados (A-F). No clado A, monofilético, encontram-se os isolados de *B. bassiana*. Estes produzem conídios globosos ou subglobosos, típicos desta espécie. O clado C, por outro lado, é filogeneticamente distinto do clado A, com morfologia também distinta. No clado B está situada a espécie *B. brongniartii*, no clado D, *B. caledonica* e *B. vermiconia*. No clado E, está *Cordyceps scarabaiicola* e no clado F, *B. amorpha*. A árvore filogenética pode ser visualizada na (FIGURA 1), de acordo com Rehner e Buckley (2005):

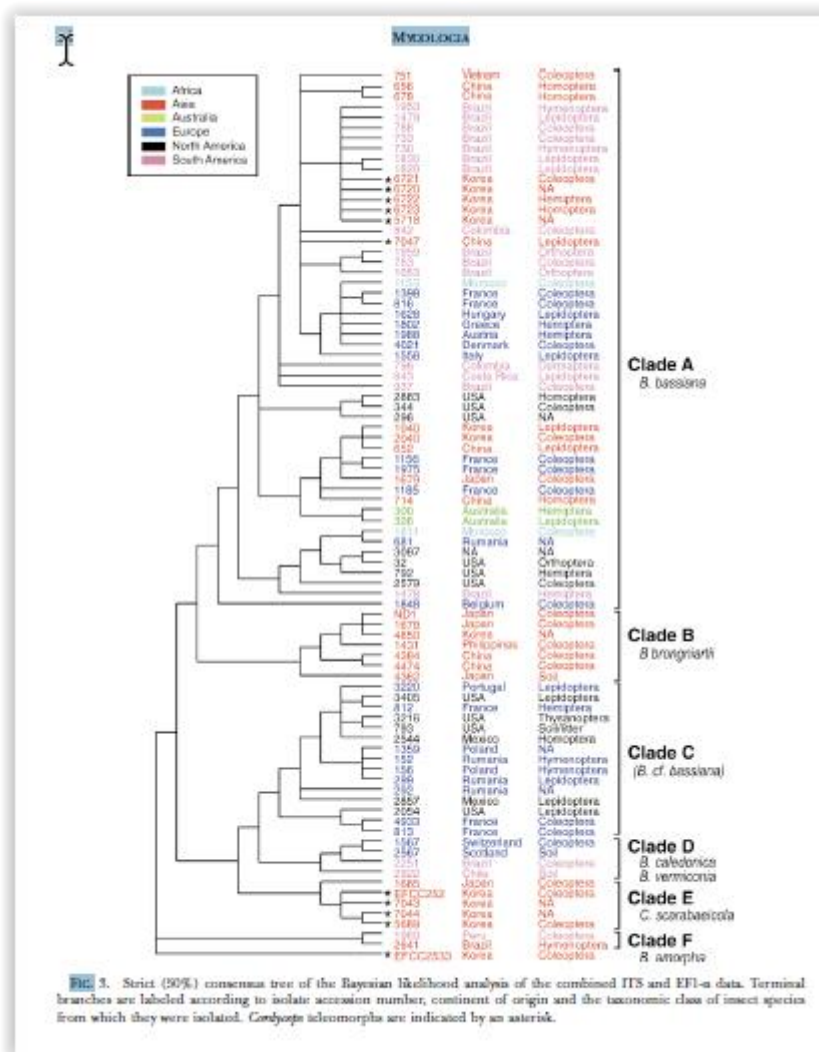


FIGURA 1 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS CLADOS DE *Beauveria bassiana*. FONTE: REHNER E BUCKLEY (2005).

2.7 Morangueiro e *Duponchelia fovealis*

A *Fragaria*, comumente chamada de morangueiro, pertence à Família Rosaceae, da Ordem Rosales (JUDD, 2009). O morangueiro atualmente cultivado (*Fragaria x ananassa* Duch., Rosaceae), originou-se do cruzamento entre *Fragaria chiloensis* e *F. virginiana*, ocorrido espontaneamente na França, por volta de 1750. É uma planta herbácea, rasteira e, embora tenha características de cultura perene, é cultivada como anual (SANTOS, 1999).

A produção de morangos no Brasil tem crescido nos últimos anos; estimando-se uma produção anual de 100 mil toneladas, com área ocupada de

3.500ha. Sua produção está concentrada nas regiões sul e sudeste, sendo os estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul os maiores produtores. Por ser uma cultura que abrange um grande contingente de mão-de-obra, o morango apresenta uma importância social e econômica muito grande, sendo geradora de emprego e renda para as comunidades envolvidas (ANTUNES et al., 2007).

Uma lagarta originária da região mediterrânea e Ilhas Canárias foi identificada no Brasil atacando folhas, flores, coroa e frutos do morangueiro. Em infestações severas debilita as plantas, reduzindo a produtividade podendo levá-las à morte. A área de distribuição natural da micro-mariposa *Duponchelia fovealis* Zeller, 1847 (Lepidoptera: Pyraloidea: Crambidae: Spilomelinae) inclui a região mediterrânea e Ilhas Canárias. É encontrada em partes da África, Ásia Menor e vários países da Europa. Foi registrada a ocorrência em 2005 em plantas de begônia no Canadá, no sul de Ontário, e, em 2008, nos Estados Unidos da América, na Califórnia, em plantas ornamentais. Este é o primeiro registro da espécie na América do Sul e associada à cultura do morangueiro. (PIMo, 2016).

Para avaliar a viabilidade destes fungos entomopatogênicos podem ser realizados bioensaios, que consistem em procedimentos para avaliar a resposta biológica provenientes de produtos naturais de origem vegetal ou animal ou mesmo de produtos de síntese orgânica.

A lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), foi registrada no país em 2011, alimentando-se de morangueiros no Paraná (ZAWADNEAK et al., 2011). Por ser uma praga recente, não há inseticidas registrados para seu controle e sua característica polífaga pode levar ao ataque outras culturas, além do morango (BRAMBILA; STOCKS, 2010; ZAWADNEAK et al., 2015). O controle biológico por meio de fungos entomopatogênicos surge como uma estratégia contra essas mariposas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Foram utilizadas 10 plantas de milho (*Zea mays*) (obtidas de propriedade particular, na cidade de Curitiba, PR), das quais foram coletadas, aleatoriamente, duas folhas, totalizando 20 folhas, que foram submetidas ao isolamento descrito a seguir.

3.2. Isolamento (PIMENTEL, 2001)

Foram coletadas 2 folhas de cada uma das 10 plantas de milho selecionadas. Cada folha foi lavada em água corrente, com o auxílio de uma esponja macia, visando remover contaminantes do ambiente. Estas folhas foram então fragmentadas em pedaços (Fig.2) menores e estes tiveram o mesófilo vedado com parafina derretida, de modo que as substâncias utilizadas na desinfecção superficial não penetrassem o mesófilo foliar e eliminassem os microrganismos endofíticos.

Cada fragmento da folha foi submetido à uma esterilização superficial (Fig.2), que consiste na imersão em água destilada duas vezes, um minuto em álcool 70%, 4 minutos em hipoclorito de sódio 3%, 30 segundos em álcool 70% e, finalmente, lavado em água destilada três vezes por um minuto. Feita a desinfecção superficial, estes fragmentos maiores foram cortados assepticamente a fim de gerar 12 fragmentos menores (aproximadamente 1 cm²), os quais foram depositados em 60 placas (4 fragmentos por placa) contendo meio BDA acrescido do antibiótico estreptomicina (100 µg/mL), totalizando 240 fragmentos (Fig.02). Posteriormente, as placas foram identificadas, incubadas a 28 ±0,5 °C e analisadas diariamente por 30 dias, ou até que todos os fungos tivessem sido isolados. Os isolados foram repicados em tubos contendo meio BDA inclinado, incubados a 28 ±0,5 °C por 7 dias e após o crescimento, armazenados a 4°C. A identificação dos isolados consiste em um código alfanumérico (Fig.3) que representa o fragmento do qual ele é

proveniente, contendo uma letra inicial “P”, com o número da planta, seguido da letra “F”, com o número da folha e da repetição e por fim, a letra do fragmento originário e número por ordem de aparecimento (por exemplo: P1F2R2A1 - Planta 1, folha 2, repetição 2, fragmento A, fungo 1).

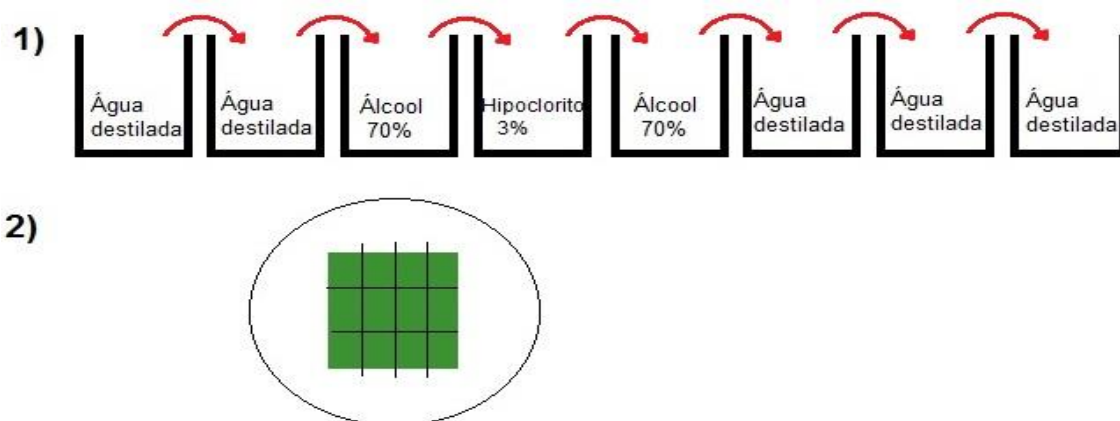


Figura 02 - Esquema do isolamento de fungos endofíticos de folhas 1) Desinfecção das folhas. 2) Corte dos fragmentos. Fonte: O autor (2016).

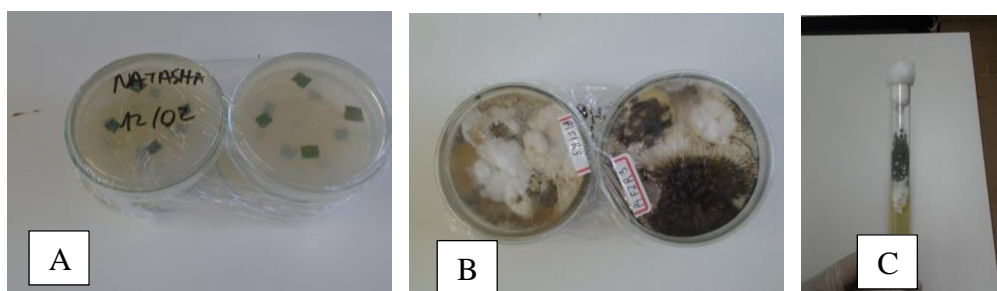


Figura 03 - Isolamento de fungos endofíticos de folhas. A) Placas identificadas e com os fragmentos da folha do milho. B) Placas com os fungos já crescidos. C) Tubo com meio inclinado contendo o fungo isolado. Fonte: O autor (2016).

3.3 Identificação clássica

3.3.1 Macromorfologia

Após a obtenção dos isolados fúngicos, foi feita a separação dos mesmos em grupos morfológicos, utilizando como critérios as características macromorfológicas das colônias, após crescimento em BDA por 7 e 14 dias

numa temperatura de $28 \pm 0,5$ °C (Fig.4). Estas características são: cor e aspecto do verso e reverso da colônia, diâmetro, aspecto das bordas, textura, e formato aproximado da colônia.



Figura 04 - Verso e reverso do fungo isolado, em meio BDA, após crescimento a $28 \pm 0,5$ °C por 7 dias. Fonte: O autor (2016).

3.3.2 Micromorfologia

3.3.2.1 Técnica do microcultivo (KERN; BLEVINS, 1999)

Visando a obtenção de estruturas reprodutivas íntegras, para a identificação fúngica que auxiliam nas identificações, os fungos foram cultivados, utilizando a técnica do microcultivo (KERN; BLEVINS, 1999), na qual o fungo é inoculado nas faces laterais de cubos de meio de cultura BDA, com aproximadamente 1cm^3 dispostos sobre lâminas cruzadas, que se encontram dentro de uma placa de Petri esterilizada. Sobre os cubos, são depositadas lamínulas que ao final do tempo ideal de cultivo (7 e 14 dias) a $28 \pm 0,5$ °C são colocadas sobre uma lâmina para microscopia com uma gota de lactofenol de Amann e seladas com esmalte incolor (Fig.5).



Figura 05 - Identificação de fungos endofíticos através da técnica de microcultivo.

Fonte: O autor (2016)

3.4. Bioensaio

3.4.1. Insetos utilizados

Os insetos utilizados nos bioensaios são provenientes da criação de *Duponchelia. fovealis* (Figura 6) mantidas em Laboratório de entomologia Prof Angelo Moreira da Costa Lima, UFPR. As lagartas até o 3° ínstar são alimentadas por dieta artificial desenvolvida para *D. fovealis* (GONÇALVES et al., 2012) e a criação permanece em sala climatizada (temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $60 \pm 10\%$, fotofase de 14 horas).



Figura 6 – Lagartas de *Duponchelia fovealis* em 3° instar com dieta.

3.4.2. Produção de esporos (ALVES, 1998).

Foi selecionada uma linhagem de *Beauveria bassiana* (CG25), armazenada na coleção biológica do LabMicro-DPAT-UFPR. Esta foi inoculada em placas de Petri com meio Agar Sabouraud Dextrose e mantidas em estufa B.O.D. ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$, fotofase: 14h) por 14 dias. Após este período, os esporos foram coletados com alça de platina e inoculados em 10 mL de solução salina 0,9% esterilizada, agitados em Vortex por um minuto e sua concentração foi estimada em câmara de Neubauer. A concentração da suspensão foi padronizada para $1,0 \times 10^8$ esporos.mL⁻¹ (Fig. 7).

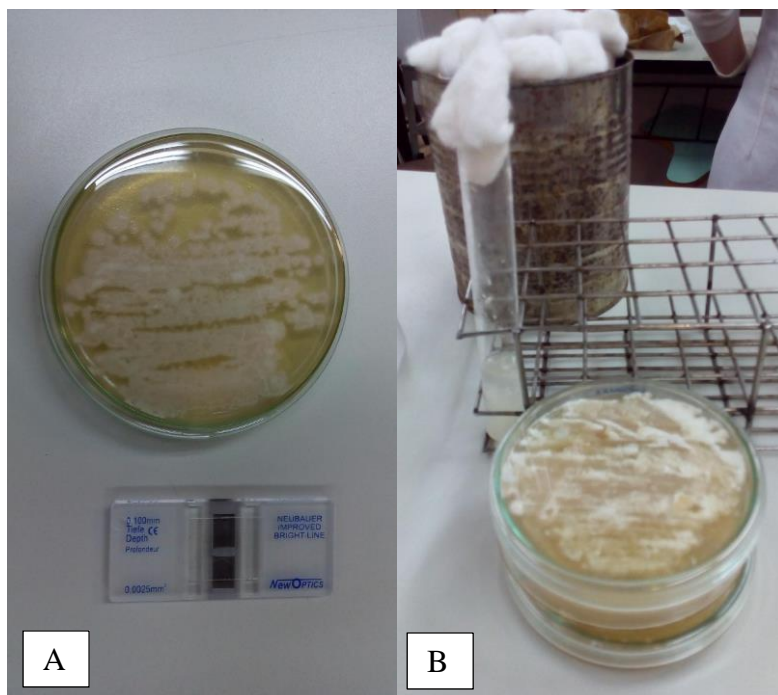


Figura 07 - Placas de Petri contendo *Beauveria bassiana* linhagem Bb CG 25 após crescimento em estufa B.O.D. ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$, fotofase: 14h) por 14 dias. Fonte: O autor (2016).

3.4.3 Seleção dos fungos entomopatogênicos virulentos

Foram realizados dois experimentos, em momentos distintos. Ambos os bioensaios seguiram um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com 3 tratamentos e 4 repetições. Em cada repetição foram expostas 10 lagartas de *D. fovealis*. Os tratamentos consistiram de:

T1 – Solução salina 0,9% (controle negativo)

T2 – Suspensão de esporos de *Beauveria bassiana* linhagem CG25 ($1,0 \times 10^8$ esporos.mL⁻¹)

T3 – Suspensão de Bovemax (Novozymes) conforme instruções do fabricante.

BoveMax EC é um inseticida biológico que tem como ingrediente ativo esporos do fungo *Beauveria bassiana*. Para aumentar a eficiência do bioinseticida, ele é formulado em emulsão oleosa, que proporciona uma maior estabilidade, proteção UV, aderência ao inseto, além de facilitar a pulverização. O produto não é fitotóxico quando aplicado nas doses e época recomendada.

BoveMax possui concentração de $1,5 \times 10^9$ esporos viáveis por ml de produto, sendo que 1 litro é suficiente para tratar 1 hectare. É necessário diluir 1 litro de bioinseticida em 200 litros de água/ha. (GRAVENA, 2013)

3.4.3.1 Experimento 1

Folhas de morangueiro, mantidas em casa de vegetação no Departamento de Patologia Básica, foram coletadas e lavadas em água corrente. Em seguida, foi feita a desinfecção superficial das mesmas, que permaneceram por 4 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 3% e foram então lavadas em água destilada esterilizada por 30 segundos, por 3 vezes. Estas folhas foram acondicionadas em placas de Petri esterilizadas.

O bioensaio de contato direto foi empregado de forma que, grupos de 10 lagartas de 3º instar da espécie *D. fovealis* foram confinadas em 12 placas de Petri, sendo divididas da seguinte forma: 4 repetições com o fungo *Beauveria bassiana* linhagem Bb CG 25, 4 repetições com o controle positivo BoveMax EC (Novozymes BioAg Produtos para Agricultura Ltda.) e por fim, 4 repetições com o controle negativo solução salina. As suspensões contendo os isolados e a solução salina foram inoculados na folhas previamente dispostas em placas de Petri, de forma a cobrir toda sua superfície, com uma suspensão de esporos na concentração de $1,0 \times 10^8$ esporos. mL^{-1} . Após a inoculação, as folhas foram deixadas secando por 1 hora. Em seguida, as lagartas foram transferidas individualmente com o auxílio de um pincel de cerdas macias para placas contendo as folhas já com suas respectivas concentrações das soluções, e já contendo também um algodão umedecido com água destilada esterilizada para manter a umidade do ambiente. As placas foram mantidas em condições controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $60 \pm 10\%$ e fotofase: 14 horas)(Fig.8).

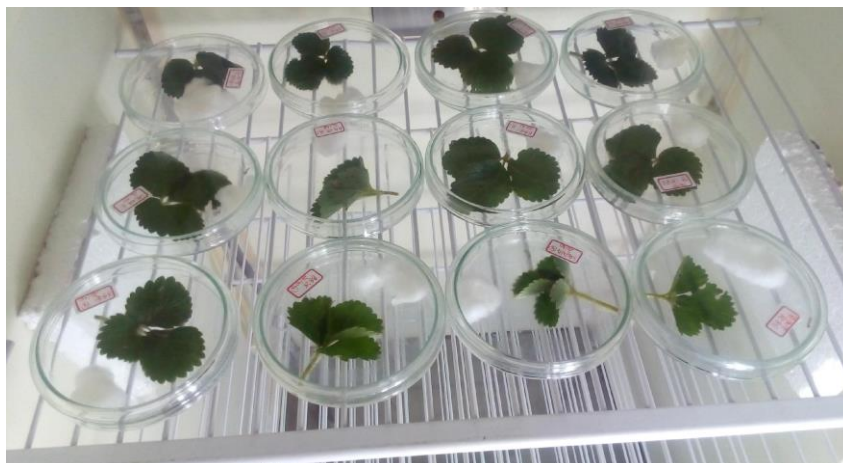


Figura 08 – Experimento 1 - Bioensaio. Folhas já inoculadas com *Beauveria bassiana* e as lagartas. Fonte: O autor (2016).

3.4.3.2 Experimento 2

Para o segundo bioensaio, foram coletadas 12 folhas de morangueiro com pecíolo, que foram lavadas e desinfectadas através de imersão em Hipoclorito de sódio 3% por 4 minutos, e 30 segundos em cada um dos 3 potes contendo água destilada. Após este processo, dentro de uma frasco estéril contendo água destilada, foi cortada uma pequena porção do pecíolo, a fim de permitir que não tenha ar em sua entrada. Então foi submerso um frasco de tamanho pequeno juntamente com um pequeno pedaço de algodão dentro deste frasco com água destilada com a intenção de fixar o pecíolo dentro do frasco para que a folha continue recebendo água (Fig.9).



FIGURA 09 – Experimento 2- Bioensaio. Folhas já inoculadas com a *Beauveria bassiana* e as lagartas. Fonte: O autor (2016)

As avaliações de mortalidade foram realizadas diariamente até o 14^o e 11^o dias, respectivamente, quando todas as lagartas haviam sido eliminadas de algum tratamento. Foram consideradas mortas as lagartas que não responderam ao estímulo proporcionado pelo toque de um pincel de cerdas finas. Os insetos mortos foram coletados e acondicionados em placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada esterilizada. As placas foram mantidas nas mesmas condições controladas ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR $60 \pm 10\%$ e fotofase: 14 horas) até a exteriorização dos fungos. Como a toxicidade é uma função da concentração do produto e do tempo de exposição foram selecionados os fungos que causaram a maior mortalidade de lagartas de 3^o instar de *D. fovealis* no menor período de tempo.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 3 tratamentos (*Beauveria bassiana* CG 25; controle positivo BOVEMAX; controle negativo solução salina) e 4 repetições.

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) e um teste de médias de Scott – Knott ($p < 0,5$) para comparação de médias, por meio do software ASSISTAT v. 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2016).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE MILHO

Para o isolamento de fungos endofíticos em laboratório a esterilização superficial das folhas, caules e sementes das plantas de interesse, é o método mais utilizado. Uma série de tempos de exposição pré-determinados a diferentes substâncias deve ser obedecida, dependendo basicamente da espessura da cutícula da epiderme dos tecidos (PEREIRA; AZEVEDO; PETRINI, 1993). Um cuidado que deve ser observado é com as condições que levam à completa eliminação dos organismos epifíticos, sem que os endofíticos sejam destruídos (PEREIRA; AZEVEDO; PETRINI, 1993; SCHULTZ et al., 1993; AZEVEDO, 1998).

Isolamento envolve a obtenção de culturas puras ou mistas do organismo de interesse, com o intuito de analisar seus produtos ou reações. Nesta fase seleciona-se a colônia através da observação da produção de determinado produto ou da morfologia da colônia (STANBURY, WHITAKER; HALL, 1995).

Após a etapa de isolamento e incubação dos fragmentos das folhas do milho, foram obtidos 241 isolados fúngicos. A partir deste resultado, é possível calcular a porcentagem de infecção da planta pelos microrganismos, que consiste na divisão do número de fragmentos com um ou mais isolados pelo número total de fragmentos iniciais, tudo isso multiplicado por 100.

Assim, com base nos resultados obtidos, tem-se que a porcentagem de infecção foi de 100%, uma vez que foram incubados inicialmente 240 fragmentos de folhas do milho e de todos os fragmentos foi obtido pelo menos um isolado fúngico.

Em trabalhos anteriores do grupo LabMicro-DPAT-UFPR (não publicados), sob as mesmas condições, as porcentagens de infecção foram de: 10,8% (2012), 65,6% (2013), 70,8% (2014) e 37,08% (2015). Este resultado pode ser explicado devido às diferenças nas condições de cultivo da planta, influência da sazonalidade, do tipo da planta e localização, além de sua

maturidade, sugerindo que a colonização dos tecidos envolva uma série de fatores. Pode-se considerar também o aspecto da planta, uma vez que a penetração de fungos endofíticos se dá por meio de aberturas naturais ou artificiais, como ferimentos causados por instrumentos agrícolas (AZEVEDO; ARAÚJO; PEIXOTO, 2002). Possivelmente, o principal motivo para esta porcentagem de infecção de 100% seja a idade da planta, pois, ao contrário dos experimentos anteriores, em que as plantas tinham aproximadamente 20 dias, neste trabalho, as plantas tinham 40 dias. A idade da planta pode ter deixado as folhas mais suscetíveis à entrada dos endófitos, pois ficaram expostas por mais tempo às condições ambientais, bem como a agentes naturais, como insetos e aves.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

4.2.1. MACROMORFOLOGIA

Os isolados obtidos foram crescidos em tubo inclinado contendo meio Sabouraud Dextrose em estufa B.O.D. com temperatura entre $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$ de umidade e fotofase: 14h por 14 dias, e tiveram suas características macromorfológicas comparadas e descritas. Aqueles que compartilhavam as mesmas características foram agrupados em morfogrupos.

As características avaliadas foram:

- a) Cor e aspecto do verso da colônia
- b) Cor e aspecto do reverso da colônia
- c) Diâmetro da colônia após 14 dias de crescimento em BDA
- d) Aspecto e forma dos bordos
- e) Produção de substâncias e pigmentos

Foram obtidos 39 grupos morfológicos, que podem ser observados na TABELA 2 e Fig.10. Alguns grupos ainda não tiveram isolados identificados.

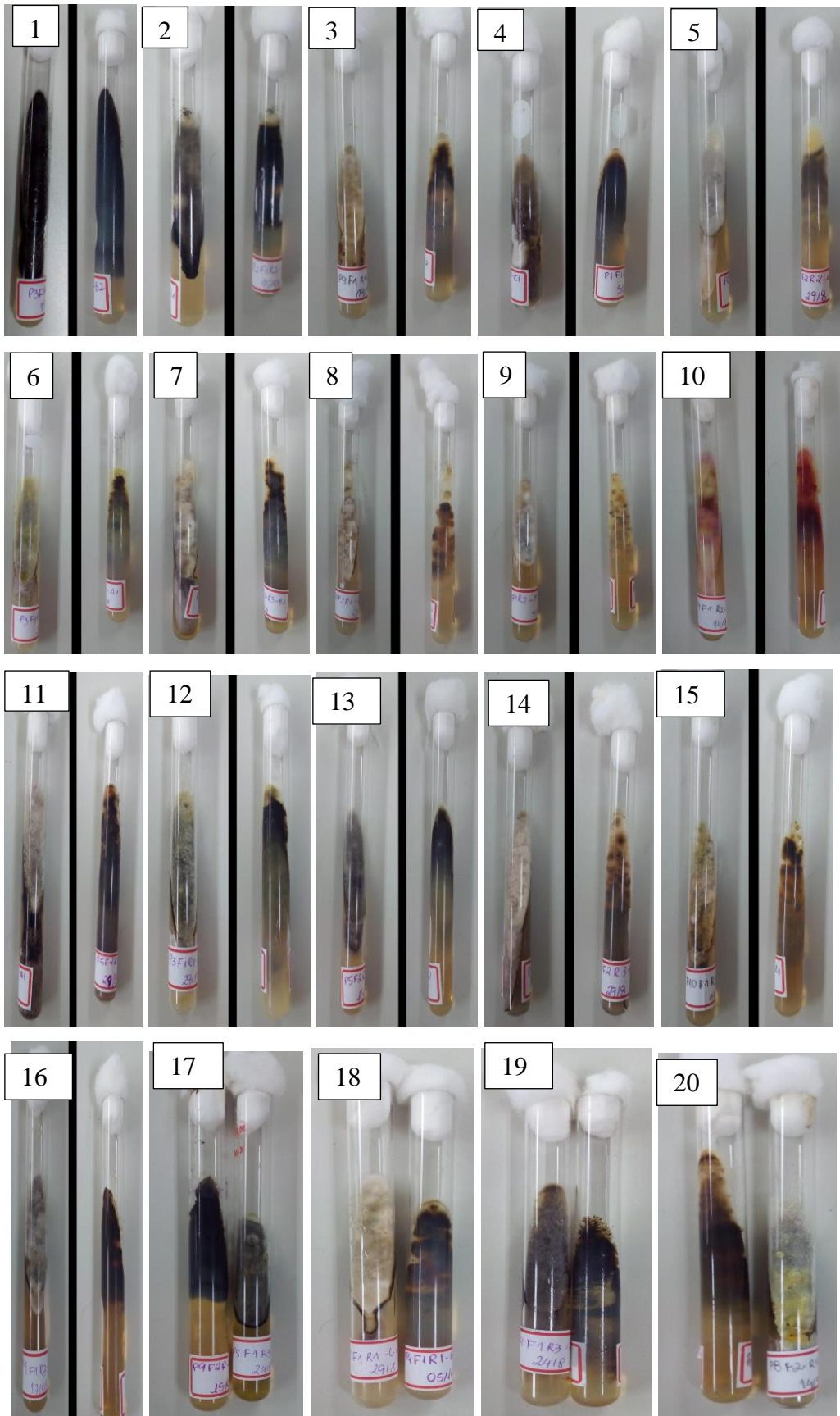
TABELA 2: DESCRIÇÃO DOS MORFOGRUPOS FÚNGICOS ISOLADOS DE PLANTAS DO MILHO.

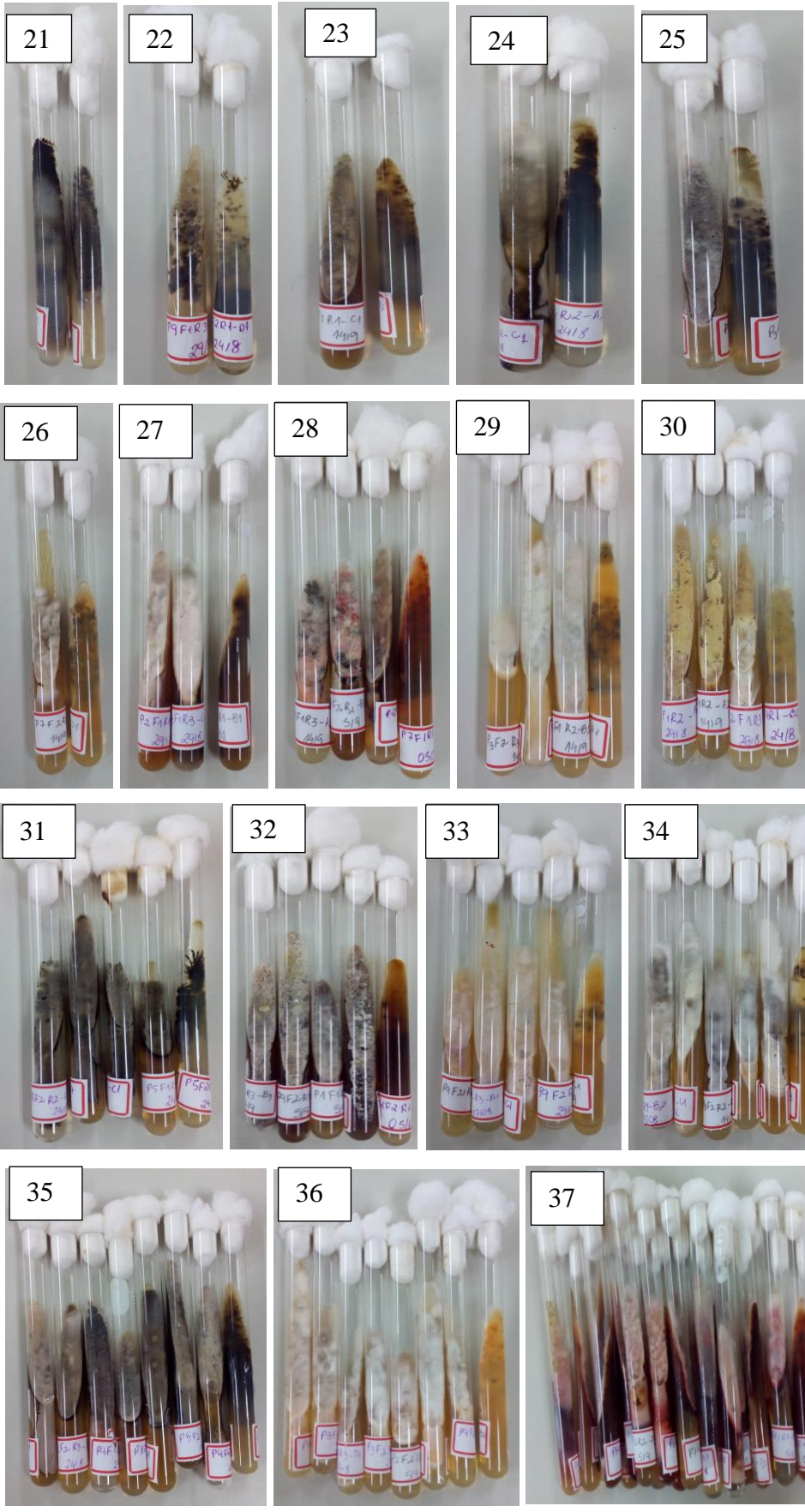
Grupo	Descrição da morfologia	Número de isolados	Identificação
1	Verso: verde escuro aveludado. Reverso: preto.	1	Não identificado
2	Verso: verde escuro algodonoso. Reverso: preto.	1	Não identificado
3	Verso: amarelo esverdeado algodonoso. Reverso: marrom escuro com bordas beges.	1	P9F1R1A2 <i>Aspergillus</i> sp
4	Verso: marrom aveludado. Reverso: marrom escuro,	1	P1F1R1C1 <i>Blastomyces</i> sp
5	Verso: branco algodonoso com fundo marrom.. Reverso: marrom com manchas bege.	1	Não identificado
6	Verso: verde claro, escuro e bege aveludados.. Reverso: marrom e bege com formato de raiz.	1	Não identificado
7	Verso: bege com pontos marrons e textura aveludada. Reverso: círculos marrom escuro.	1	Não identificado
8	Verso: círculos bege aveludado. Reverso: círculos marrom e marrom escuro.	1	Não identificado
9	Verso: branco com pontos pretos aveludado. Reverso: branco com pontos pretos.	1	Não identificado
10	Verso: rosa e amarelo algodonoso. Reverso: rosa.	1	P9F1R2B1 <i>Fusarium</i> sp
11	Verso: bege e verde claro aveludado. Reverso: muitos pontos marrom escuro.	1	Não identificado
12	Verso: verde claro com fundo marrom com textura. Reverso: marrom escuro e verde.	1	Não identificado
13	Verso: fundo verde escuro com camada superior branco aveludada Reverso: verde escuro.	1	Não identificado
14	Verso: bege com camada salmão aveludada por cima. Reverso: marrom com formas marrom escuro espalhadas aleatoriamente..	1	Não identificado
15	Verso: verde, salmão e amarelo aveludado com	1	Não identificado

	produção de gotículas verdes. Reverso: marrom escuro, salmão e verde.		
16	Verso: fundo preto com camada branca algodonosa. Reverso: marrom escuro.	1	Não identificado
17	Verso: verde escuro aveludado com bolotas Reverso: preto.	2	Não identificado
18	Verso: fundo verde com manchas salmão. Reverso: marrom escuro com mancha salmão.	2	P4F1R1B1 <i>Aspergillus</i> sp
19	Verso: marrom escuro com aspecto de raiz. Reverso: marrom escuro com aspecto de raiz.	2	Não identificado
20	Verso: amarelo fluorescente com fundo marrom com manchas brancas texturizadas. Reverso: tons de marrom.	2	P1F1R2B3 <i>Sporotrichum</i> sp
21	Verso: preto com formato de raiz. Reverso: preto com falhas em formato de raiz.	2	Não identificado
22	Verso: pontos verde escuro. Reverso: pontos verde escuro.	2	Não identificado
23	Verso: marrom com pontos marrom escuro. Reverso: marrom com pontos marrom escuro.	2	P2F1R1C1 <i>Aspergillus</i> sp
24	Verso: verde com manchas bege algodonosos. Reverso: marrom escuro.	2	Não identificado
25	Verso: fundo cinza com camada branca aveludada por cima. Reverso: cinza com manchas marrom escuro.	2	P3F1R2C2 <i>Bipolaris</i> sp
26	Verso: branco e bege aveludado com bolotas. Reverso: branco com manchas marrom.	2	Não identificado
27	Verso: salmão algodonosos mudou a cor do meio para marrom. Reverso: marrom com pintas marrom escuro.	3	Não identificado
28	Verso: rosa com manchas verdes aveludadas mudou a cor do meio para marrom . Reverso: marrom com manchas marrons.	4	P4F1R3A2 <i>Colletotrichum</i>
29	Verso: salmão/branco com manchas verdes. Reverso: manchas em vários tons de marrom.	4	P3F1R2B2 <i>Colletotrichum</i> sp
30	Verso: amarelo pulverulento.	4	P1F1R2A2

	Reverso: amarelo.		<i>Aspergillus</i> sp
31	Verso: verde escuro aveludado com forma de pseudópodos. Reverso: preto.	5	Não identificado
32	Verso: bolinhas bege mudou a cor do meio para marrom. Reverso: bolas marrom escuro.	5	Não identificado
33	Verso: salmão com poucas bolinhas pretas. Reverso: salmão com poucas bolinhas pretas.	5	P4F1R1C1 <i>Alternaria</i> sp
34	Verso: branco algodonoso com manchas cinza. Reverso: branco com manchas cinza.	6	Não identificado
35	Verso: preto com camada salmão por cima. Reverso: preto com aparência de pseudópodos.	8	Não identificado
36	Verso: branco algodonoso com bolinhas pretas e salmão. Reverso: branco com pintas salmão e preto.	8	Não identificado
37	Verso: rosa mudando a cor do meio pra rosa. Reverso: rosa com ointas pretas.	28	Não identificado
38	Verso: branco algodonoso. Reverso: branco com manchas pretas.	59	<i>Mycelia sterilia</i>
39	Verso: branco algodonoso. Reverso: branco.	66	<i>Mycelia sterilia</i>
TOTAL		241	

FONTE: O autor (2016).





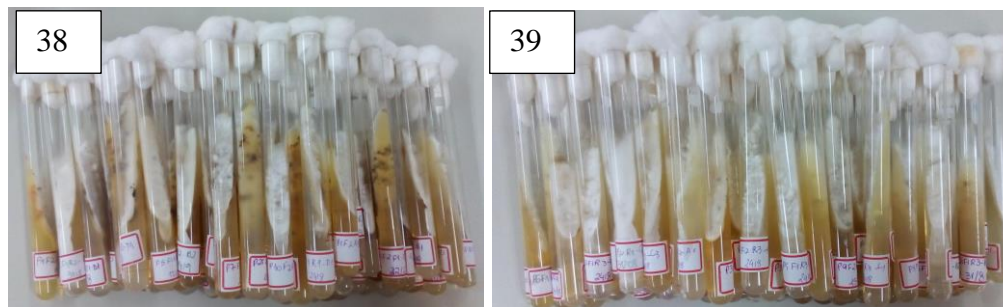


Figura 10: Fungos isolados de folhas de plantas de milho, crescidos por 14 dias em meio BDA, a $28 \pm 0,5$ °C (aumento 400x). 1) Grupo 1. 2) Grupo 2. 3) Grupo 3. 4) Grupo 4. 5) Grupo 5. 6) Grupo 6. 7) Grupo 7. 8) Grupo 8. 9) Grupo 9. 10) Grupo 10. 11) Grupo 11. 12) Grupo 12. 13) Grupo 13. 14) Grupo 14. 15) Grupo 15. 16) Grupo 16. 17) Grupo 17. 18) Grupo 18. 19) Grupo 19. 20) Grupo 20. 21) Grupo 21. 22) Grupo 22. 23) Grupo 23. 24) Grupo 24. 25) Grupo 25. 26) Grupo 26. 27) Grupo 27. 28) Grupo 28. 29) Grupo 29. 30) Grupo 30. 31) Grupo 31. 32) Grupo 32. 33) Grupo 33. 34) Grupo 34. 35) Grupo 35. 36) Grupo 36. 37) Grupo 37. 38) Grupo 38. 39) Grupo 39.

4.2.2. MICROMORFOLOGIA

Por meio da visualização das estruturas reprodutivas (micromorfologia), aliada à inspeção macromorfológica, e com o auxílio da literatura especializada (LARONE, 1995; DE HOOG et al., 1998; DE HOOG et al., 2000) foi possível identificar os seguintes gêneros fúngicos: *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Alternaria* sp., *Blastomyces* sp., *Sporotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Acremonium* sp. (Fig.11) e *Mycelia sterilia* (não mostrado). *M. sterilia* caracteriza-se por produzir micélio hialino e abundante, sem estruturas reprodutivas.

O gênero *Blastomyces* sp. pode ser encontrado no solo e em material em decomposição no ambiente, como folhas e madeira. É um fungo demáceo e contém duas espécies, *B. dermatidis*, causador da Blastomicose, uma micose crônica que se caracteriza pela presença de granulomas e estágios pulmonares, ósseos e cutâneos; e *B. gilchristi* (RIPPON, 1988).

Sporotrichum sp. é um fungo filamentosos, pertencente ao filo Basidiomycota, encontrado largamente distribuído no ambiente, em solo e madeira, sendo considerado frequentemente um contaminante. Uma única espécie, *S. pruinosum*, já foi descrita como patogênica em humanos (LARONE, 1995)

A maioria dos fungos isolados no presente trabalho já haviam sido encontrados também em trabalhos anteriores realizados pelo grupo LabMicro-DPAT-UFPR (não publicados). Foram isolados *Curvularia* sp, *Bipolaris* sp, *Alternaria* sp, *Drechslera* sp, *Acremonium* sp e *Aspergillus* sp (2007). Em 2012, *Penicillium* sp, *Alternaria* sp, *Epicoccum* sp, *Bipolaris* e *Cladosporium* sp. *Nigrospora* sp., *Curvularia* sp. e *Alternaria* sp. também foram obtidos em 2013. Em todos os isolamentos realizados, assim como neste trabalho, uma grande parte dos isolados foi classificada como *Micelya sterillia*.

Dentre estes gêneros, *Penicillium*, *Epicoccum* e *Bipolaris* são fungos saprófitos encontrados no ambiente, e que podem ter potencial patogênico aos humanos imunodeprimidos. *Alternaria* pode ser, em alguns casos, um

patógeno vegetal e *Cladosporium* é um dos fungos mais comumente encontrados no ar e, em geral, são considerados contaminantes.

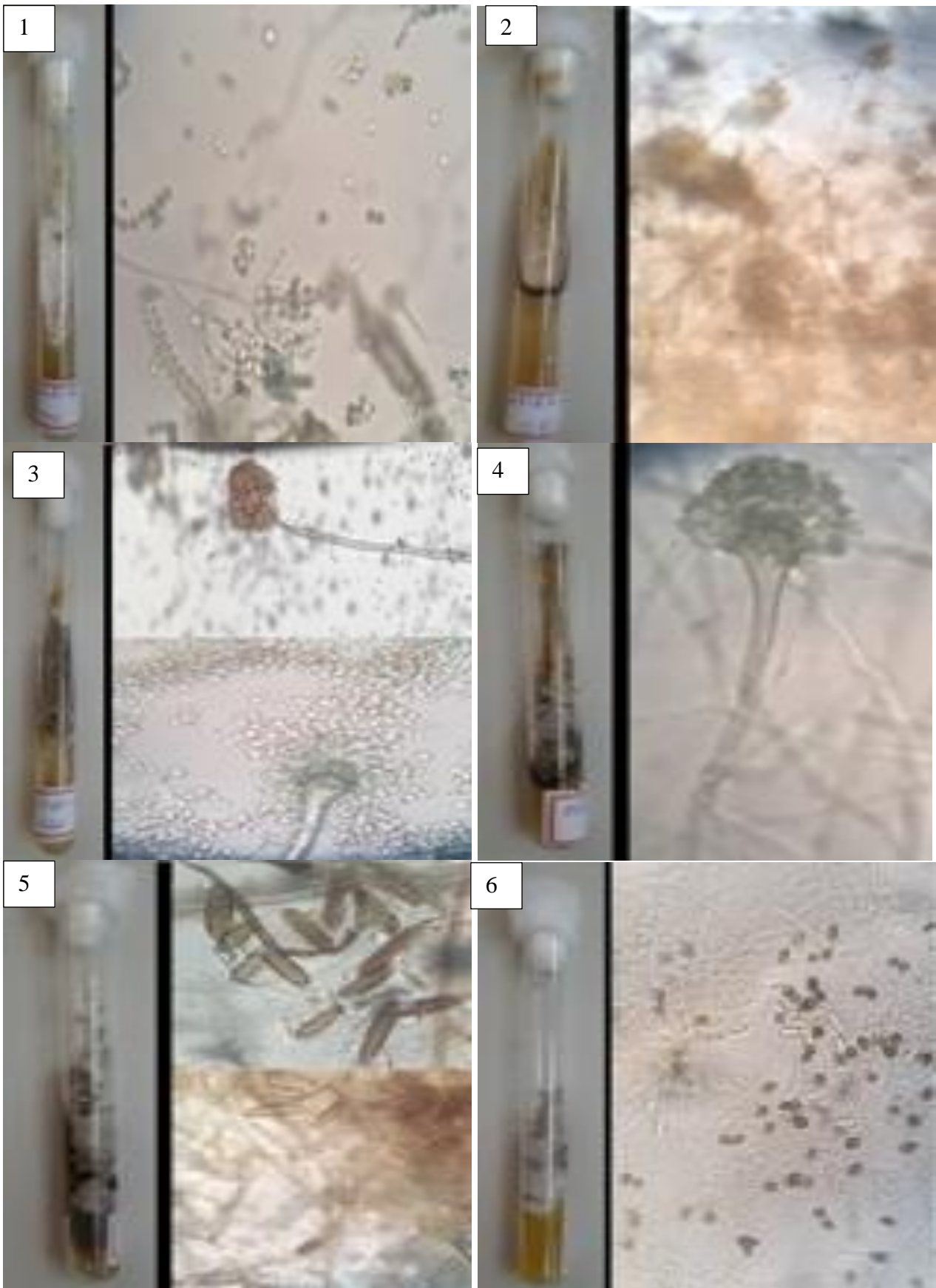
Tais resultados são compatíveis com os obtidos por outros autores (PAMPHILE, 1997; SILVA, 1997; PIMENTEL, 2001; PAMPHILE; AZEVEDO, 2002), indicando que tais gêneros fúngicos podem ter importante relação com as plantas de milho, podendo participar de seu crescimento ou proteção.

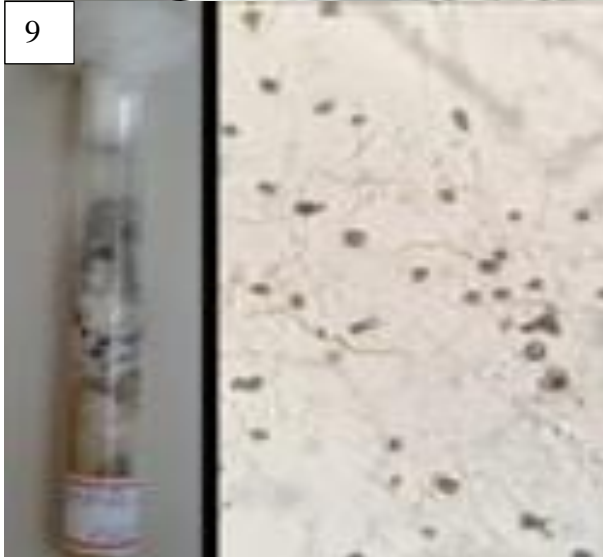
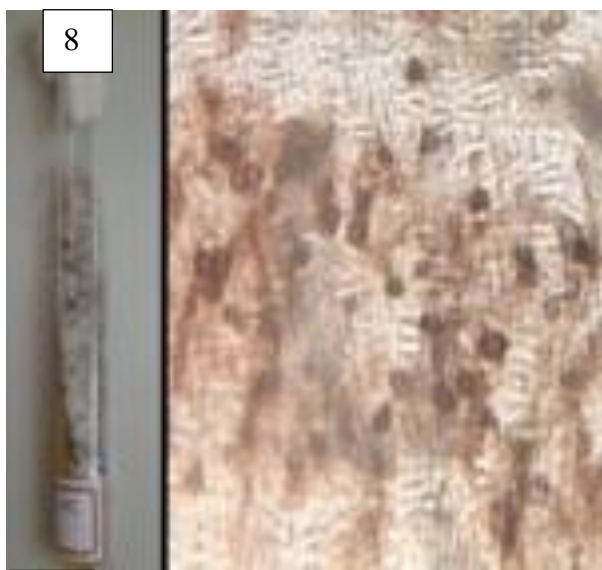
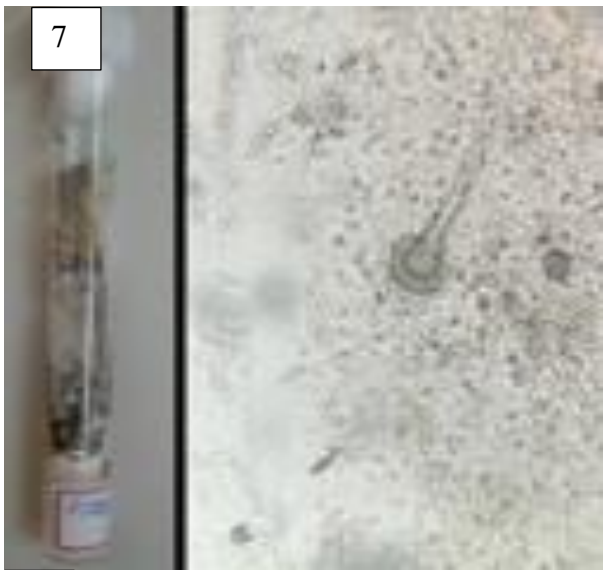
Almeida, Yara e Almeida (2005), obtiveram de ápices caulinares de plantas adultas de pupunheira cultivadas no campo as seguintes espécies: *Fusarium* sp., *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *Colletotrichum* sp., *Alternaria gaisen*, *Epicoccum nigrum* e *Neotyphodium* sp.

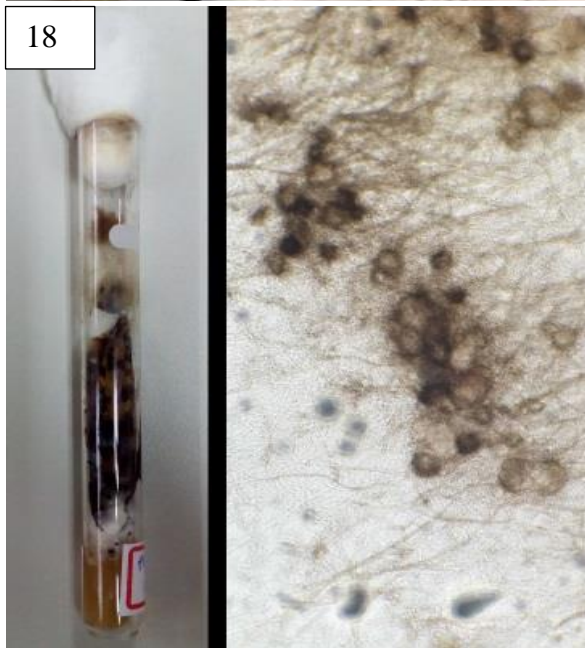
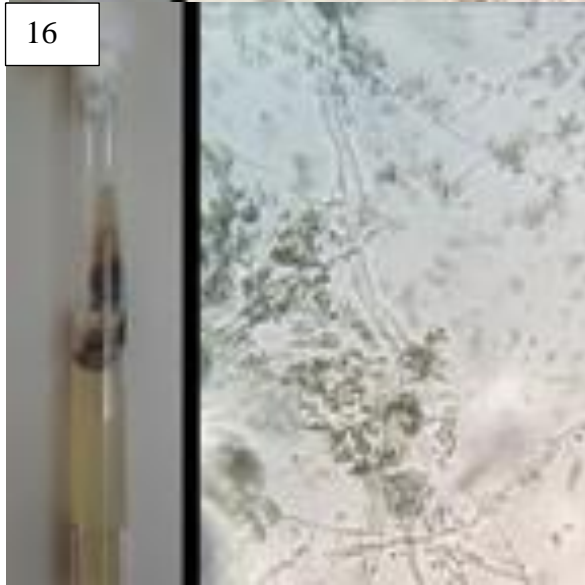
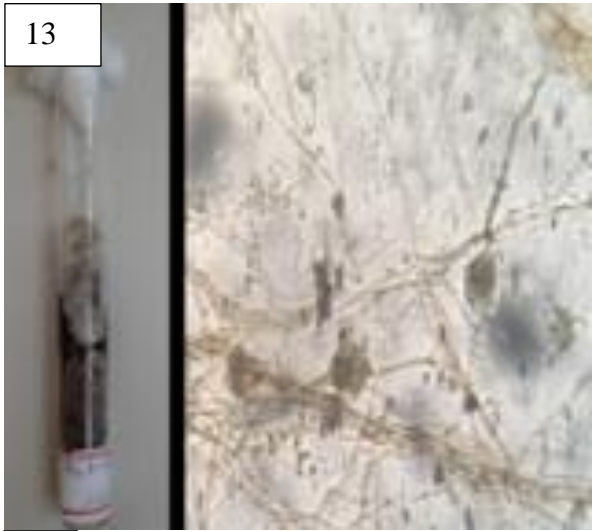
Em *Eremanthus erythropappus*, popularmente conhecida como Candeia, foram isolados 8 gêneros fúngicos: *Phomopsis* (38,9%), *Xylaria* (37,1%); *Dothiorella* (8,8%), *Nigrospora* (8,0%) e *Fusarium* (0,9%); *Cladosporium* (4,4%); *Alternaria* (0,9%) e *Aspergillus* (0,9%). (MAGALHÃES, 2015).

Penna (2000) encontrou, em erva mate, onze grupos de fungos pertencentes aos gêneros *Phyllosticta*, *Colletotrichum*, *Ascochyta*, *Xylaria*, *Nodulisporium*, *Cladosporium* e *Fusarium*, outros não identificados das famílias Dematiaceae e Moniliaceae e também *Mycelia sterilia*.

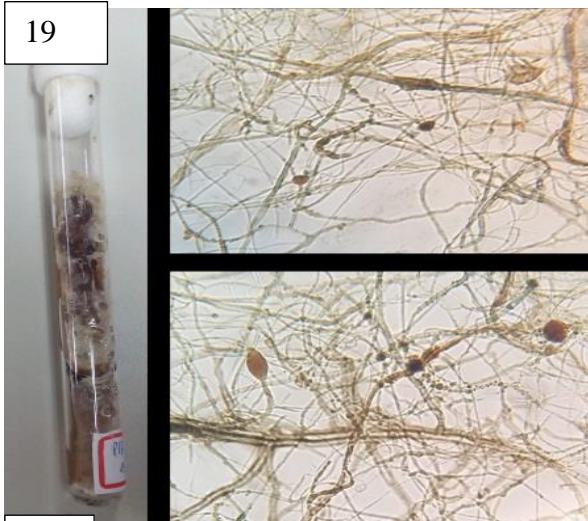
Pimentel et. al. (2006) obtiveram, a partir do isolamento de milho, os gêneros *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Dendrophoma* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Scopulariopsis* sp., *Trichoderma* sp., *Verticillium* sp.. Dentre os gêneros observados, destacam-se fungos patogênicos dos gêneros *Colletotrichum* (agente da antracnose), *Fusarium* (agente da podridão de estacas), *Rhizoctonia* (agente do tombamento de mudas) (AUER; GRIGOLETTI JUNIOR, 1995). Outros fungos interessantes são pertencentes aos gêneros *Trichoderma* e *Verticillium*, agentes de controle biológico de doenças de plantas e de insetos, respectivamente (VIÉGAS, 1979).



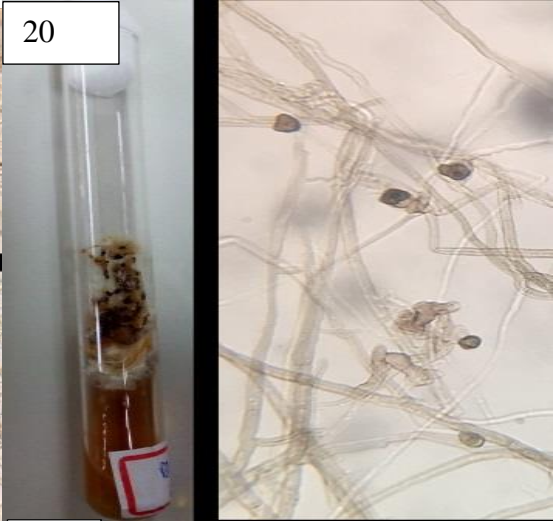




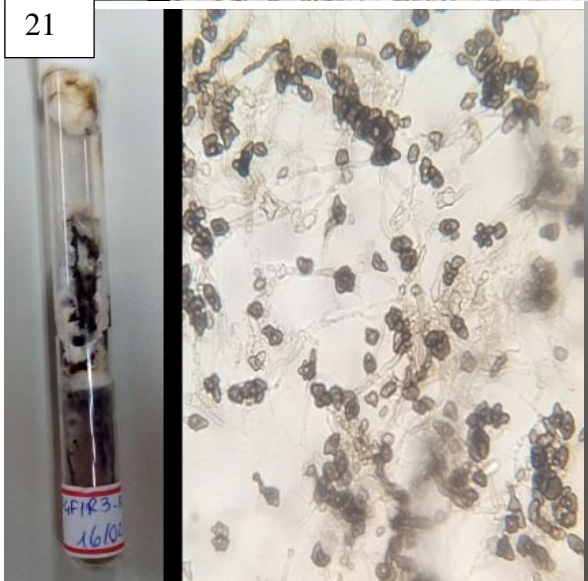
19



20



21



22



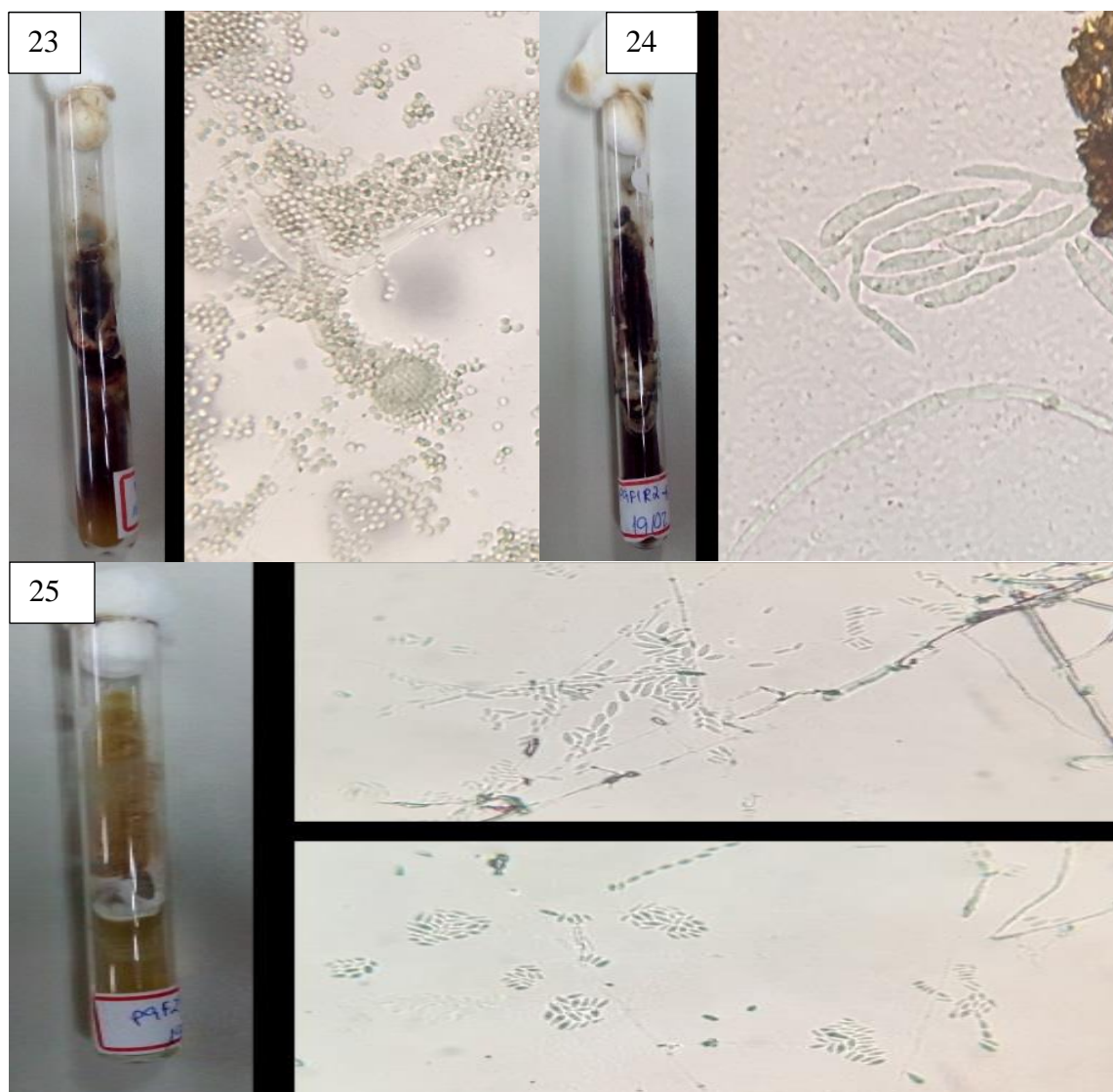


FIGURA 11 –Macro e micromorfologia de fungos isolados de folhas de plantas de milho, crescidos por 14 dias em meio BDA, a $28 \pm 0,5$ °C (aumento 400 x). 1) P1F1R1B1 *Penicillium* sp., 2) P1F1R2A2 *Aspergillus* sp., 3) P2F1R1C1 *Aspergillus* sp., 4) P2F1R3C1 *Aspergillus* sp., 5) P2F2R2B1 *Bipolaris* sp., 6) P2F2R2C1 *Colletotrichum* sp., 7) P2F2R2C2 *Aspergillus* sp., 8) P2F2R3A2 *Colletotrichum* sp., 9) P3F1R1C1 *Colletotrichum* sp. 10) P3F1R2B2 *Colletotrichum* sp., 11) P3F1R2C2 *Bipolaris* sp., 12) P3F2R2C2 *Curvularia* sp., 13) P4F1R1B1 *Aspergillus* sp., 14) P4F1R1C1 *Alternaria* sp., 15) P5F2R3A1 *Penicillium* sp., 16) P9F1R1A2 *Aspergillus* sp., 17) P10F2R2C1 *Colletotrichum* sp. 18) P1F1R1C1 *Blastomyces* sp. 19) P1F1R2B3 *Sporotrichum* sp. 20) P2F1R3A1 *Colletotrichum* sp. 21) P2F2R3 *Colletotrichum* sp. 22) P4F1R3A2 *Colletotrichum* sp. 23) P6F1R3C2 *Aspergillus* sp. 24) P9F1R2B1 *Fusarium* sp. 25) P9F2R2A2 *Acremonium* sp. Fonte: O autor (2016).

Como não foram isolados fungos com potencial entomopatogênico como endofíticos do milho, optou-se por utilizar o entomopatógeno *Beauveria bassiana* da coleção do LabMicro-DPAT-UFPR, no bioensaio para controle da lagarta *Duponchelia fovealis*, uma praga do morangueiro.

5.3. BIOENSAIO

O bioensaio foi realizado utilizando a linhagem CG25 do entomopatógeno *Beauveria bassiana* da coleção biológica do LabMicro-DPAT-UFRP, o produto comercial BOVEMAX (Novozymes), folhas de moragueiro do cultivar da UFRP e lagartas da espécie *Duponchelia fovealis* também do viveiro da Universidade.

Foram realizados dois experimentos, em momentos distintos. Ambos os bioensaios seguiram um Delineamento Inteiramente Casualizado, com 3 tratamentos, 4 repetições, 10 lagartas por repetição. Os tratamentos consistiram de:

T1 – Solução salina 0,9% (controle negativo)

T2 – Suspensão de esporos de *Beauveria bassiana* linhagem CG25 ($1,0 \times 10^8$ esporos.mL⁻¹)

T3 – Suspensão de Bovemax (Novozymes) conforme instruções do fabricante.

No primeiro experimento, o tempo total de análise da mortalidade foi de 14 dias, e os resultados podem ser observados na TABELA 3.

TABELA 3. Mortalidade de *Duponchelia fovealis* submetidas a tratamento com *B. bassiana* – Experimento 1

Tratamento	REPETIÇÕES							
	Repetição 1		Repetição 2		Repetição 3		Repetição 4	
	Vivo	Morto	Vivo	Morto	Vivo	Morto	Vivo	Morto
T1	3	7	3	7	5	5	0	10
T2	1	9	3	7	4	6	2	8
T3	0	10	0	10	0	10	0	10

Nota. V: lagartas vivas; M: lagartas mortas aos 14 dias de experimento

Os resultados da TABELA 3 foram transformados para \log_x+1 , de modo que os valores pudessem ser avaliados estatisticamente visando à diminuição dos desvios.

Após a análise de variância (TABELA 4), obteve-se um valor de F significativo ao nível de 5% de probabilidade (4.3319 *).

TABELA 4. Análise de variância do experimento 1

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	0.05897	0.02948	4.3319 *
Resíduo	9	0.06125	0.00681	
Total	11	0.12022		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

Assim, foi realizado um teste de médias, Scott - Knott para verificar se há diferença estatística entre os tratamentos. De acordo com os resultados obtidos, as médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Assim, percebe-se que o controle positivo, representado pelo produto comercial Bovemax, foi mais eficiente na mortalidade dos insetos, enquanto o tratamento com a linhagem CG25 de *Beauveria bassiana* não diferiu do tratamento controle com solução salina 0,9%.

Médias de tratamento

T1	1.84730	b
T2	1.85565	b
T3	2.00000	a

MG = 1.90098

CV% = 4.34

Ponto médio = 1.84950

No segundo experimento, o tempo total de análise da mortalidade foi de 11 dias, e os resultados podem ser observados na TABELA 5.

TABELA 5. Mortalidade de *Duponchelia fovealis* submetidas a tratamento com *B. bassiana* – Experimento 2

Tratamento	REPETIÇÕES							
	Repetição 1		Repetição 2		Repetição 3		Repetição 4	
	Vivo	Morto	Vivo	Morto	Vivo	Morto	Vivo	Morto
T1	6	4	8	2	6	4	4	6
T2	6	4	7	3	4	6	6	4
T3	4	6	0	10	0	10	4	6

Nota. Vivo: lagartas vivas; Morto: lagartas mortas aos 14 dias de experimento.

Os resultados da TABELA 5 foram transformados para $\log x + 1$, de modo que os valores pudessem ser avaliados estatisticamente visando à diminuição dos desvios.

Após a análise de variância (TABELA 6), obteve-se um valor de F significativo ao nível de 5% de probabilidade (6.8021 *).

TABELA 6. Análise de variância – experimento 2

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	0.27009	0.13504	6.8021 *
Resíduo	9	0.17868	0.01985	
Total	11	0.44877		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

O F foi significativo ao nível de 5% de probabilidade (6.8021 *), assim, foi realizado um teste de médias, Scott - Knott para verificar se há diferença estatística entre os tratamentos.

Médias de tratamento

1	1.57085	b
2	1.57085	b
3	1.88910	a

MG = 1.67693

CV% = 8.40

Ponto médio = 1.65050

Assim, como observado no experimento 1, percebe-se que o controle positivo, representado pelo produto comercial Bovemax, foi mais eficiente na mortalidade dos insetos, enquanto o tratamento com a linhagem CG25 de *Beauveria bassiana* não diferiu do tratamento controle com solução salina 0,9%. Foi possível observar, após tratamento e mortalidade por Bovemax, a exteriorização do micélio fúngico (Fig.12)



FIGURA 12 – Exteriorização do micélio de *Beauveria bassiana* (tratamento com Bovemax) em lagarta *D. fovealis*.

Dalzoto et al. (2009) testaram a eficiência da linhagem CG25 de *Beauveria bassiana* contra o percevejo marrom da soja, *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae), e observaram mortalidade de insetos após 5 dias de tratamento. Ainda, os insetos mortos apresentaram exteriorização de hifas, que foram confirmadas como sendo pertencentes à mesma linhagem, utilizando marcadores RAPD.

Embora a linhagem CG25 de *Beauveria bassiana* tenha sido eficiente contra uma espécie de percevejo, é possível que a mesma não tenha a mesma ação contra a lagarta da coroa. Por outro lado, é esperado que o produto

comercial Bovemax, que já é utilizado contra diferentes insetos em diversas culturas, tenha um maior efeito contra *D. fovealis*.

Novos experimentos deverão ser conduzidos, com outras linhagens de *Beauveria bassiana* e também com outros entomopatógenos de modo a testar sua eficiência contra esta praga do morangueiro.

Ainda, novos experimentos de bioprospecção poderão ser realizados, isolando fungos não apenas de plantas de milho, mas também de outras culturas, no intuito de aumentar o número de isolados de fungos entomopatogênicos na coleção biológica do LabMicro/DPAT/UFPR, visando novos bioensaios contra *D. fovealis* e outros insetos pragas importantes.

6. CONCLUSÕES

1. Foram obtidos 241 isolados fúngicos endofíticos de plantas de milho, resultando numa frequência de infecção de 100%.
2. Os isolados foram caracterizados por macromorfologia em 39 morfogrupos.
3. Os gêneros encontrados foram *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Alternaria* sp., *Blastomyces* sp., *Sporotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Acremonium* sp.. Também foram isolados exemplares de *Mycelia sterilia*.
4. Não foram isolados fungos entomopatogênicos.
5. Foi observada a maior mortalidade de *Duponchelia fovealis*, praga do morangueiro, quando utilizado o produto comercial Bovemax (formulação a base de *Beauveria bassiana*). O tratamento com a linhagem CG25 de *B. bassiana* não foi estatisticamente diferente do tratamento com solução salina 0,9% (controle negativo).

REFERÊNCIAS

- ABRAMILHO – Associação Brasileira dos produtores de milho. **Milho da safra 2016/2017**. 10/2016.
- AINSWORTH, G.C. BASSI, A., 1773-1856. **Nature**, London, v.177, p.255-257, 1956.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/institucional/faleconosco/FaleConosco.asp>. Acesso em: 24/09/2014.
- AKELLO, J.T., DUBOIS, T., GOLD, C.S., COYNE, D., NAKAVUMA, J., PAPARU, P., **Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (Musa spp.)**. J. Invertebr. Pathol. 96, 34–42. 2007.
- ALLES, G. C.; HÜBNER, M.; FIUZA, L. M. **Toxicologia de Bacillus thuringiensis às pragas urbanas e vetores**. Rev. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento nº 38, p. 44-46. Brasília, 2010.
- ALMEIDA, C.V., YARA, R., ALMEIDA, M., **Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada in vivo e in vitro**. Pesquisa Agropecuária Brasileira 40.5, 467-470, 2005.
- ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. São Paulo: Fealq, 1998. 1163p.
- ANTUNES, L. E. C.; DUARTE FILHO, J. D.; CALEGARIO, F. F.; COSTA, H.; REISSER JUNIOR, C. **Produção integrada de morango (PIMo) no Brasil**. In: **Morango: conquistando novas fronteiras**. Informe Agropecuário: Belo Horizonte, v.28, n.236, p.34-39, jan./fev. 2007.
- ARNOLD, A.E., LEWIS, L.C., **Ecology and evolution of fungal endophytes and their roles against insects**. In: Vega, F.E., Blackwell, M. (Eds.), **Insect–Fungal Associations: Ecology and Evolution**. Oxford University Press, New York, pp. 74–96. 2005.
- AUER, C. G.; GRIGOLETTI J., A. **Doenças da erva-mate**. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 21, n. 3-4, p. 195-198, 1995.
- AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; FUNGARO, M. H. P. **Molecular Characterization of Paecilomyces fumoroseus (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Isolates**. Scientia Agrícola, Piracicaba, v.57, n.4, p.729-732, 2000.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C., **Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.)** Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 2000.

AZEVEDO, J. L., **Microrganismos endofíticos.** Ecologia microbiana. Jaguariúna: EMBRAPA, p. 117-137, 1998.

BING, L.A., LEWIS, L.C., **Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera:Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin.** Environ. Entomol. 20, 1207–1211, 1991.

BING, L.A., LEWIS, L.C., **Temporal relationships between *Zea mays*, *Ostrinia nubilalis* (Lep: Pyralidae) and endophytic *Beauveria bassiana*.** Entomophaga 37, 525–536, 1992a.

BING, L.A., LEWIS, L.C., **Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: The influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner).** Biocontrol Sci. Technol. 2, 39–47, 1992b.

BISWAS, C., DEY, P., SATPATHY, S., SATYA, P., **Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as a season long endophyte in jute (*Corchorus olitorius*) and its rapid detection using SCAR marker.** BioControl 57, 565–571. 2012.

BRAMBILA, J.; SOCKS, I. (2010) **The European pepper moth, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a Mediterranean pest moth discovered in central Florida.** FDACS - Division of Plant Industry. Disponível: http://www.freshfromflorida.com/pi/pest_alerts/pdf/duponchelia_fovealis.pdf>. Consultado em: 12 de junho de 2013.

CARVALHO, R. da S. **Biocontrole de moscas-das-frutas: histórico, conceitos e estratégias.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, (Circular técnica 83). 2006.

CHERRY, A.J., LOMER, C.J., DJEGUI, D., SHULTHESS, F., **Pathogen incidence and their potential as microbial control agents in IPM of maize stem borers in West Africa.** BioControl 44, 301–327. 1999.

CHERRY, A.J., BANITO, A., DJEGUI, D., LOMER, C., **Suppression of the stem-borer *Sesamia calamistis* (Lepidoptera; Noctuidae) in maize following seed dressing, topical application and stem injection with African isolates of *Beauveria bassiana*.** Int. J. Pest Manag. 50, 67–73. 2004.

CLAY, K. **Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*.** Oecologia, Berlin, v.73, p.358-362, 1987.

CLEMENTE, S. L.; PIKE, K. S.; KAISER, W. J., WILSON, A. D. **Resistance of endophyte-infected plants of tall fescue and perennial ryegrass to the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphidae).** Journal of the Kansas Entomological Society, Manhattan, v.63, n.4, p.646-648, 1990.

CARROLL, G. C. **Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont.** Ecology, Brooklym, v.69, p. 2-9, 1988.

CLARK, C. L.; MILLER, J. D.; WHITNEY, N. J. **Toxicity of conifer needle endophytes to spruce budworm.** Mycological Research, Cambridge, v.93, p.508-512, 1989.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Levantamento da produção de grãos.** Fevereiro de 2014.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Análise dos custos de produção e rentabilidade da cultura do milho.** 2016.

DALZOTO, P. R., UHRY, K. F. **Controle biológico de pragas no Brasil por meio de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill.** *Biológico, São Paulo* 71.1, 37-41. 2009.

DE HOOG, G. S., B. BOWMAN, Y. GRASER, G. HAASE, M. EL FARI, A. VAN DEN ENDE, B. MELZER-KRICK, and W. A. UNTEREINER. 1998. **Molecular phylogeny and taxonomy of medically important fungi.** *Med Mycol.* 36:52-56.

DE HOOG, G. S., J. GUARRO, J. GENE, and M. J. FIGUERAS. **Atlas of Clinical Fungi**, 2nd ed, vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. 2000.

GASSEN, D.N. **Manejo de pragas associadas à cultura do milho.** Passo Fundo: Aldeia Norte, 134 p., 1996.

GRAVENA, S., et al. **Uso de Bovemax® EC (*Beauveria bassiana*) no manejo da broca do café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari)(Coleoptera: Scolytidae) no cafeeiro.** (2013).

- GRIFFIN, M.R., OWNLEY, B.H., KLINGEMAN, W.E., PEREIRA, R.M., **Biocontrol of Rhizoctonia damping-off of cotton with endophytic *Beauveria bassiana***. *Phytopathology*. 95, 36–42. 2005.
- GONÇALVES, R. B.; ZAWADNEAK, M. A. C.; SANTOS, B.; LIMA, J. D.; ARTMANN NETO, G.; ZAWADNEAK, E.; BISCOFF, A. **Parâmetros biológicos de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) em diéta artificial**. 2012.
- GURULINGAPPA, P., SWORD, G.A., MURDOCH, G., MCGEE, P.A., **Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta**. *Biol. Cont.* 55, 34–41. 2010.
- HALLMAN, J.A.; QUADT-HALMANN, W.; MAHAFFEE, F.; KLOEPPER, J.W. **Bacterial endophytes in agricultural crops**. *Canadian Journal of Microbiology*, v.43, p.895-914, 1997.
- HARAPRASAD, N.; NIRANJANA, S.R.; PRAKASH, H.S.; SHETTY, H.S.; WAHAB, S. *Beauveria bassiana* – A potential mycopesticide for the efficient control of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) in India. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.11, n.2, p.251-260, 2001.
- HAWKINS, B.A.; CORNELL, H.V. **Theoretical approaches to biological control**. Cambridge: Cambridge University, 412p., 1999.
- JONES, K.D., **Aspects of the biology and biological control of the European corn borer in North Carolina**. Ph.D. Thesis, North Carolina State University. 1994.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; PETER F. STEVENS, P.F. & DONOGHU, M.J. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**. Porto Alegre: Artmed, 632p, 2009.
- KERN, M.E.; BLEVIS, K.S. **Microbiologia Médica**. Segunda edição. São Paulo: Editora Premier, 1999.
- LARONE, D. H. 1995. **Medically Important Fungi – A Guide to Identification**, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- LATCH, C. G. M.; CHRISTENSEN, M. J. Artificial infection of grasses with endophytes. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.107, p.17-24, 1985.

LECKIE, B.M., **Effects of *Beauveria bassiana* mycelia and metabolites incorporated into synthetic diet and fed to larval *Helicoverpa zea*, and detection of endophytic *Beauveria bassiana* in tomato plants using PCR and ITS.** M.S. Thesis, The University of Tennessee. 2002.

LEWIS, L.C., BRUCK, D.J., GUNNARSON, R.D., BIDNE, K.G., **Assessment of plant pathogenicity of endophytic *Beauveria bassiana* in Bt transgenic and nontransgenic corn.** *Crop Sci.* 41, 1395–1400. 2001.

LI Z.Z., LI C.R., HUANG B., FAN M.Z., **Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus.** *Chinese Sci Bull*, 46:751-753. 23. 2001.

LOMER, C.J., CHERRY, A., DENIS, D., **Systemic *Beauveria* isolates for control of maize stem borers in Africa.** In: **Proceedings of the 30th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology**, Banff, Canada, p. 44. 1997.

LOPES, R. B. **Controle de *Blattella germanica* (L.) com *Metarhizium anisopliae* e Inseticidas Reguladores de Crescimento.** 137f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MAGALHÃES, W. C. S., et al. **ENDOPHYTIC FUNGI DIVERSITY OF IN *Eremanthus erythropappus* (DC.) MACLEISH.** *Cerne* 14.3, 267-273, 2015.

MALAGODI, M.; VEIGA, A.F.S.L. **Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Balls) Vuill. sobre o cupim *Nasutitermes* (DUDLEY) (ISOPTERA:TERMITIDAE) em laboratório.** *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*, Itabuna, v.24, n.2, p.315-322, 1995.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cultura de milho**, 2016.

MARTINS, S.F.S.; LIMA, M.G.A., **Fungos entomopatogênicos no controle do percevejo do colmo do arroz *Tibraca limbativentris* STAL., virulência de isolados de *B. bassiana* (Bals) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok.** *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*, Itabuna, v.23, n.3, p.379-383, 1994.

OKI, Y.; SOARES, N.; BELMIRO, M. S.; CORRÊA JUNIOR, A.; FERNANDES, G. W. **Influência dos fungos endofíticos sobre os herbívoros de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae).** *Neotropical Biology and Conservation*, Sao Leopoldo, v. 4, n. 2, p. 83-88, 2009.

- ORLANDELLI, R. C. & PAMPHILE, J. A. **Fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* como agente de controle biológico de insetos pragas.** SaBios: Rev. Saúde e Biol., v.6, n.2, p.79-82, mai. /Ago. Maringá, 2011.
- OWNLEY, B.H., PEREIRA, R.M., KLINGEMAN, W.E., QUIGLEY, N.B., LECKIE, B.M., ***Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pests and plant pathogens.** In: Lartey, R.T., Cesar, A.J. (Eds.), Emerging Concepts in Plant Health Management. Research Signpost, India, pp. 255–269. 2004.
- OWNLEY, B.H., GRIFFIN, M.R., KLINGEMAN, W.E., GWINN, K.D., MOULTON, J.K., PEREIRA, R.M., ***Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control.** J. Invert. Pathol. 98, 267–270. 2008.
- PAMPHILE, J.A.; AZEVEDO, J.L. **Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (= *Fusarium moniliforme*) from maize (*Zea mays* L.).** World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18: 391-396, 2002.
- PARSA, S., ORTIZ, V., VEGA, F.E., **Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control.** J. Vis. Exp., e50360 <http://dx.doi.org/10.3791/50360>. 2013.
- PENNA, E. B. da S. **Microrganismos endofíticos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e variabilidade genética em *Phyllosticta* sp. por RAPD.** 123f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.
- PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. **Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a preliminary study.** Mycologia, Lancaster, v.85, p.362-364, 1993.
- PEREIRA, J.O.; VIEIRA, M.L.; AZEVEDO, J.L. **Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants.** World Journal of Microbiology and Biotechnology. V.15, p.43-46, 1999.
- PETRINI, O. **Fungal endophytic of tree leaves.** In: ANDREWA, J.; HIRANO, S.S. (Ed). Microbial Ecology of Leaves. Sping Verlag, p.179-197, 1991.
- PIMENTEL, I. C. **Fungos endofíticos do milho (*Zea mays* L.) e da soja (*Glycine Max* (L) Merrill) e seu potencial biotecnológico no controle de pragas agrícolas.** Curitiba, 2001. 154 p. Tese (doutorado) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2001.

PIMENTEL, I. C., et al. **Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.)**. *Floresta* 36.1, 2006.

POMARI-FERNANDES, ALINE, et al. "**Utilização de *Telenomus remus* para controle de *Spodoptera frugiperda*: manutenção e incremento do agroecossistema.**" *Cadernos de Agroecologia* 9.1, 2014.

POSADA, F., VEGA, F.E., **Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*)**. *Mycologia* 97, 1195–1200. 2005.

POSADA, F., AIME, M.C., PETERSON, S.W., REHNER, S.A., VEGA, F.E., **Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales)**. *Mycol. Res.* 111, 749–758. 2007.

REHNER S.A., BUCKLEY E., ***Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs** *Mycologia*, 97(1), pp. 84–98. 2005.

RIPPON, J.W. 1988. **Medical Mycology**. 3rd Edition. W.B. Saunders Co., Philadelphia, USA.

RODRIGUEZ, R.J., WHITE Jr., J.F., ARNOLD, A.E., REDMAN, R.S., **Fungal endophytes: diversity and functional roles**. *New Pathol.* 182, 314–330. 2009.

SANTOS, A.M. **Melhoramento genético do morangueiro**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.27, n.198, p.24-29, 1999.

SANTOS, J. P. **Controle de Pragas Durante o Armazenamento de Milho**, *Circular Técnica* 84, Sete Lagoas MG., 2006.

SCHULTZ, B.; WANKE, U.; DRAEGER, S.; J-AUST, H. **Endophytes from herbaceous plants and Shrubs: effectiveness of surface sterilization methods**. *Mycological Research, Cambridge*, v.97, p.1447-1450, 1993.

SILVA, C.A.D. Selection of isolates of *Beauveria bassiana* pathogenic to cotton boll weevil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.2, p.243-247, 2001.

SILVA, F.A.S., AZEVEDO, C.A.V. The Assistat Software Version 7.7. and its use in the analysis of experimental data. **Afr. J. Agric. Res.** Vol. 11 (39), pp. 3733-3740, 29, 2016.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology**. Second Edition. Butterworth Heinemann, Elsevier Science, 1995, 357 p.

STROBEL, A. G. **Endophytes as sources of bioactive products**. *Microbes and Infection*, Paris, v.5. p.535-544, 2003.

TONET, G.L.; REIS, E.M., .Patogenicidade de *Beauveria bassiana* em insetos pragas da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.14, p.89-95, 1979.

TORRECILLAS, S. M.; VENDRAMIM, J. D. **EXTRATO AQUOSO DE RAMOS DE *Trichilia pallida* E O DESENVOLVIMENTO DE *Spodoptera frugiperda* EM GENÓTIPOS DE MILHO**, *Scientia Agricola*, v.58, n.1, p.27-31, jan./mar. 2001.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, **Produção integrada de Mogrango. PIMo**, <http://www.bio.ufpr.br/portal/pimo/duponchelia/>. Acesso em: 18/11/2016.

URIBE D., KHACHATOURIANS G.G., **Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial genome of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reveals high intraspecific variation**. *Mycol Res*, 108:1070-1078, 2004.

VAKILI, N.G., **Biocontrol of stalk rot in corn**. In: **Proceedings of the Forty-fourth Annual Corn and Sorghum Industry Research Conference**, Chicago, IL. American Seed Trade Association, Washington, DC, pp. 87–105. December 6–7, 1990.

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

VEGA, F.E., MARK, S., GOETTEL, M.S., BLACKWELL, M., CHANDLER, D., et al., **Fungal entomopathogens: new insights in their ecology**. *Fungal Ecol.* 2, 149–159. 2009.

VIÉGAS, A. P. **Dicionário de fitopatologia e micologia**, São Paulo: Ceres, 882p. 1979.

VILAS-BOAS, A.M. Efeito de inseticidas em subdoses sobre o fungo *Beauveria bassiana* e sobre as brocas da cana-de-açúcar. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.34, n.2, p.287-302, 1991.

VILAS-BOAS, A.M.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; LUNA-ALVES-LIMA, E.A., Desenvolvimento e aperfeiçoamento de inseticidas biológicos para o controle de pragas. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.35, n.4, p.749-761, 1992.

WAGNER, B.L., LEWIS, L.C., **Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana***. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3468–3473. 2000.

WHITE Jr, J. F.; COLE, G. T. **Endophyte-host associations in forage grasses. I. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*.** Mycologia, Lancaster, v.77, p.323-327, 1985.

WILSON, A. D.; CLEMENTE, S. L.; KAISER, W. J. Survey and detection of endophytic fungi in *Lolium* germ plasm by direct staining and aphyi assays. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, p.169-173, 1991.

ZAWADNEAK, M. A.C.; GONÇALVES, R. B.; KUHN, E.; ARAUJO, E.; DOLCI, E.; SANTOS, B.; SILVA, C.; BENATTO, A. VIDAL, H. **Novo desafio**, Revista Cultivar HF, Edição Agosto/ Setembro, p. 30-32, 2011.

ZAWADNEAK MAC, VIDAL HR, SANTOS B. Lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). In: Vilela, E; Zucchi, RA. **Pragas Introduzidas: Insetos e Acaros**. Piracicaba: ESALQ/ FEALQ. FEALQ. 2015.