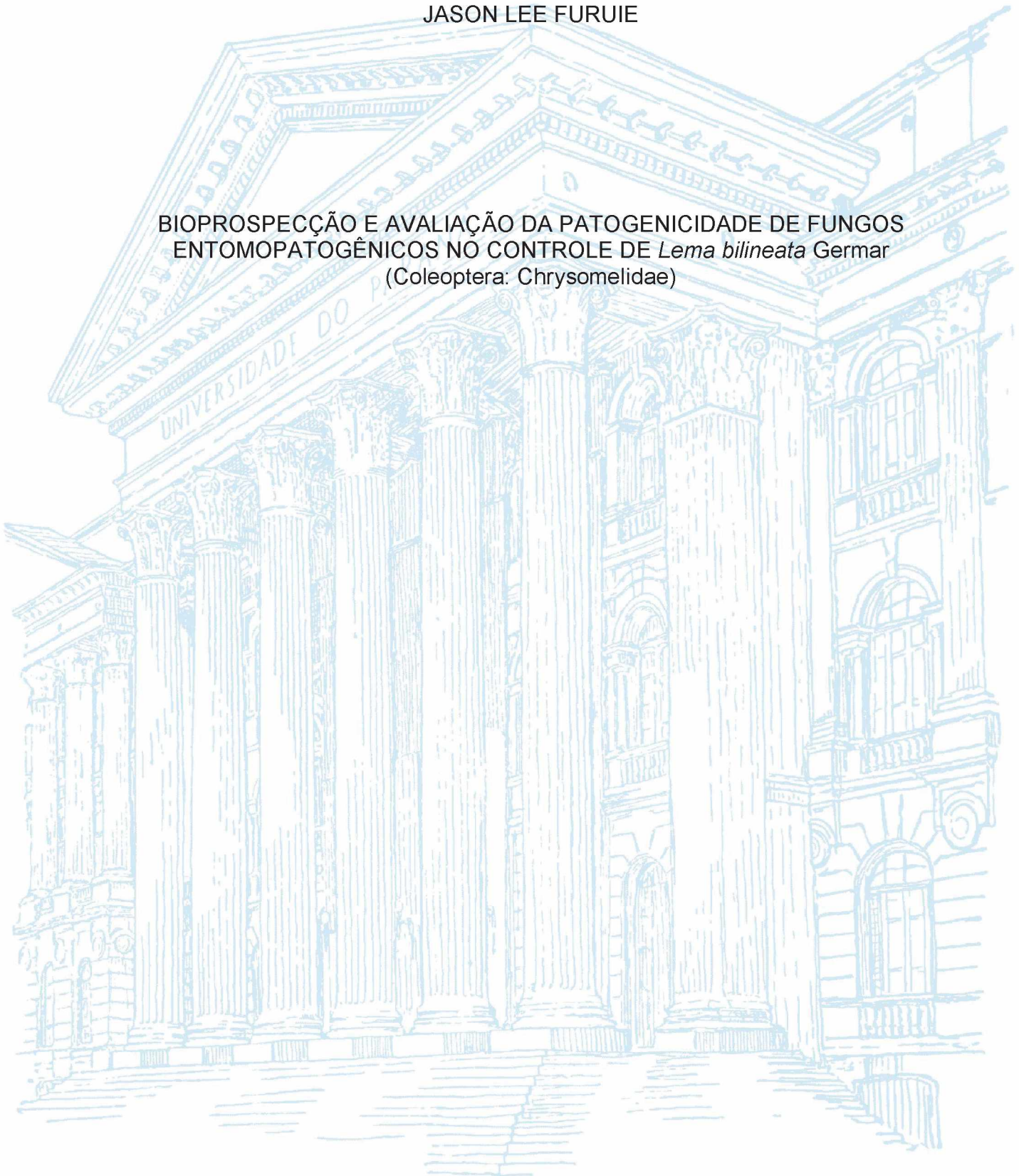


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JASON LEE FURUIE

BIOPROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DE *Lema bilineata* Germar
(Coleoptera: Chrysomelidae)



CURITIBA
2022

JASON LEE FURUIE

BIOPROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DE *Lema bilineata* Germar
(Coleoptera: Chrysomelidae)

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ida Chapaval Pimentel

Coorientadora: Prof^a. Dra. Maria Aparecida Cassilha Zawadneak

Coorientadora: Dra. Emily Silva Araujo

CURITIBA
2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Furuie, Jason Lee

Bioprospecção e avaliação da patogenicidade de fungos entomopatogênicos no controle de *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) / Jason Lee Furuie. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia..

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ida Chapaval Pimentel.

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Maria Aparecida Cassilha Zawadneak.

Coorientadora: Dra. Emily Silva Araujo.

1. Physalis. 2. Crisomelideo. 3. Bioprospecção. 4. Fungos entomopatogênicos . I. Pimentel, Ida Chapaval. II. Zawadneak, Maria Aparecida Cassilha, 1961-. III. Araujo, Emily Silva. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de JASON LEE FURUIE intitulada: **BIOPROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DE *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae)**, sob orientação da Profa. Dra. IDA CHAPAVAL PIMENTEL, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 11 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica
14/03/2022 11:07:38.0
IDA CHAPAVAL PIMENTEL
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
15/03/2022 11:05:10.0
ALEX SANDRO POLTRONIERI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica
14/03/2022 15:18:07.0
MAGDA FERNANDA PAIXÃO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
14/03/2022 10:34:10.0
JOATAN MACHADO DA ROSA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
15/03/2022 10:19:46.0
EDSON JOSÉ MAZAROTTO
Avaliador Externo (UNIENSINO)

Aos meus queridos pais,
Ademar Sueki Furuie e Lesly Miki Abe Furuie

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, especialmente:

A Deus, por me dar sabedoria para entender que esta jornada é apenas uma etapa e não o fim de um propósito.

Aos meus pais, Ademar Sueki Furuie e Lesly Miki Abe Furuie, pela minha formação, apoio, amor e suporte incondicional.

À Prof^a Dra. Ida Chapaval Pimentel, pela orientação, amizade, confiança e ensinamentos valiosos.

À Prof^a Dra. Maria Aparecida Cassilha Zawadneak, pela orientação, confiança, disponibilidade, visão e experiência incríveis.

À Dra. Emily Silva Araujo e ao Dr. José Manoel Mirás-Avalos, pela orientação, ajuda e contribuições de grande valia.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela oportunidade única de aperfeiçoamento com ensino público e de qualidade.

Às chefias e suplências das chefias do Departamento de Patologia Básica, do Setor de Ciências Biológicas, durante meu período de doutorado, Patrícia Dalzoto, Andrey de Andrade, Lucy Ono, Adriana Mercadante, Edneia Cavaliere e Magda Ribeiro, pelo incentivo e apoio na busca pelo meu aperfeiçoamento.

Aos meus amigos dos Laboratórios de Microbiologia e Biologia Molecular e de Entomologia Agrícola do Departamento de Patologia Básica, pelo companheirismo, palavras de força, ajuda, apoio e suporte, em especial à Morgana Voidaleski, Andressa Stuart, Franciele Baja e Isabela Pauluk.

Aos Técnicos de Laboratório e Técnicos Administrativos do Departamento de Patologia Básica, Luciane Hennig, Eliana Leite, Luiz Oractz, Fábio Chimentão, Mário Simões e Alexandre Vieira, pelo companheirismo, amizade e acima de tudo por toda compreensão na minha falta.

À toda minha família, Dynnie, Ricardo, Érika, Marina, Jonathan, Bruna, Maria, Matheus, Kevin e Victor, por serem meu maior motivo para acreditar em um mundo melhor e por todo o amor que eu recebo de cada um.

*“Combati o bom combate,
terminei a corrida,
gardei a fé.”
(2 Timóteo 4:7-8)*

RESUMO

Lema bilineata Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) é uma praga que foi relatada recentemente causando danos na cultura de fisális (*Physalis peruviana*) no Brasil. Pela ausência de inseticidas registrados para seu controle, o uso de fungos entomopatogênicos pode ser uma estratégia sustentável e de baixo impacto ambiental no manejo integrado dessa praga. O objetivo deste trabalho foi apresentar uma nova praga do fisális, avaliar a herbivoria desta praga e coletar, isolar e avaliar a patogenicidade de fungos entomopatogênicos sobre adultos e ovos de *L. bilineata* em condições de laboratório. Foram obtidos 15 isolados provenientes de adultos mortos de *L. bilineata*, coletados em cultivo de *P. peruviana*. A caracterização morfológica e molecular identificou os isolados como sendo o fungo *Beauveria bassiana*. Uma árvore filogenética foi fornecida. De todos os isolados testados em condições controladas ($25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, $60\pm 10\%$ UR, e fotoperíodo de 12:12h (D:N)), três foram selecionados por apresentarem taxas de mortalidade contra *L. bilineata* iguais ou superiores a 80%. Tais isolados foram testados também quanto à sua ação ovicida e apresentaram taxas de mortalidade acima de 75%. Os resultados indicaram o potencial desses isolados de *B. bassiana* como agentes de controle biológico contra *L. bilineata*. Entretanto, recomenda-se que testes complementares sejam realizados para verificar a capacidade destes isolados permanecerem viáveis em condições de semi-campo e campo, visando uma possível formulação de bioinseticidas.

Palavras-chave: Fisális; *Physalis peruviana*; Controle Microbiano; MIP.

ABSTRACT

Lema bilineata Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) is a pest that was recently reported damaging the culture of cape gooseberry (*Physalis peruviana*) in Brazil. Due to the absence of insecticides registered for its control, the use of entomopathogenic fungi can be a sustainable strategy with low environmental impact in the integrated management of this pest. The aim of this study was to present a new pest of physalis, evaluate the herbivory of this pest and collect, isolate and evaluate the pathogenicity of entomopathogenic fungi against adults and eggs of *L. bilineata* under laboratory conditions. Fifteen isolates were obtained from dead adults of *L. bilineata* collected in *P. peruviana* crops. Morphological and molecular characterization identified the isolates as the fungus *Beauveria bassiana*. A phylogenetic tree was provided. Of all isolates tested under controlled conditions (25°±2C, 60±10% RH, and 12:12h photoperiod (D:N)), three isolates were selected because they showed mortality rates against *L. bilineata* equal to or greater than 80%. These isolates were also tested for their ovicidal action and showed mortality rates above 75%. The results indicate the potential of these isolates of *B. bassiana* as biological control agents against *L. bilineata*. It is recommended that further tests be performed to verify the ability of these isolates to remain viable in semi-field and field conditions, aiming at a possible formulation of bioinsecticides.

Keywords: Cape gooseberry; *Physalis peruviana*; Microbial Control; IPM.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DE *Lema bilineata*28

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE *Beauveria bassiana*42

FIGURA 2 – CONFIRMAÇÃO DO AGENTE CAUSAL EM *Lema bilineata*45

LISTA DE GRÁFICOS

MATERIAL SUPLEMENTAR

GRÁFICO 1 – VIABILIDADE DE ESPOROS DE *Beauveria bassiana*49

GRÁFICO 2 – CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA DE *Lema bilineata*50

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 – CONSUMO DE FOLHAS DE *P. peruviana* por *L. bilineata*29

CAPÍTULO 2

TABELA 1 – ISOLADOS DE *B. bassiana* utilizados em bioensaios41

TABELA 2 – MORTALIDADE DE ADULTOS DE *L. bilineata* em bioensaios de
patogenicidade.....44

TABELA 3 – MORTALIDADE DE OVOS DE *L. bilineata* em bioensaios de
patogenicidade.....46

MATERIAL SUPLEMENTAR

TABELA 1 – TEMPO MÉDIO DE SOBREVIVÊNCIA DE ADULTOS DE *L. bilineata*
em bioensaios de patogenicidade.....51

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ANOVA	- Análise de variância
BDA	- Batata dextrose ágar
FE	- Fungo entomopatogênico
DNA	- Ácido desoxirribunucleico
ITS	- Região interespaçadora
MIP	- Manejo integrado de pragas
SDA	- Sabouraud dextrose ágar
®	- Marca registrada

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. REVISÃO DA TESE	16
1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 CONTROLE BIOLÓGICO.....	18
3.2 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS	19
3.3 O GÊNERO <i>Beauveria</i>	20
REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO 2. PRIMEIRO RELATO DE <i>LEMA BILINEATA</i> GERMAR (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE) CAUSANDO DANO EM <i>PHYSALIS PERUVIANA</i> L. NO BRASIL	24
RESUMO	24
ABSTRACT	24
1 INTRODUÇÃO	25
2 MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1 Coleta e Criação de <i>L. bilineata</i>	26
2.2 Avaliação da Herbivoria de <i>L. bilineata</i>	26
2.3 Análise Estatística	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1 Coleta e Criação de <i>L. bilineata</i>	27
3.2 Avaliação da Herbivoria em <i>L. bilineata</i>	29
REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 3. ISOLAMENTO DE LINHAGENS DE <i>BEAUVERIA</i> E SEU POTENCIAL COMO AGENTES DE CONTROLE DE <i>LEMA BILINEATA</i> GERMAR (COLEOPTERA:CHRYSOMELIDAE)	33
RESUMO	33
ABSTRACT	33
1 INTRODUÇÃO	34
2 MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1 Isolamento e Identificação de Fungos Entomopatogênicos	35
2.1.1 Identificação molecular	35
2.1.2 Análise filogenética.....	37
2.2 Criação de <i>Lema bilineata</i>	38
2.3 Bioensaios de Patogenicidade	38
2.3.1 Preparo do inóculo	38
2.3.2 Efeitos dos isolados fúngicos em adultos de <i>L. bilineata</i>	38
2.3.3 Efeitos dos isolados fúngicos na viabilidade de ovos de <i>L. bilineata</i>	39
2.4 Análise Estatística	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1 Isolamento e Identificação de Fungos Entomopatogênicos	40
3.2 Efeitos dos Isolados Fúngicos em <i>L. bilineata</i>	43
3.2.1 Testes de patogenicidade em adultos.....	43
3.2.2 Testes de patogenicidade em ovos	45
CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

MATERIAL SUPLEMENTAR	49
DISCUSSÃO GERAL	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	56
REFERÊNCIAS GERAIS	57
APÊNDICE 1 – ARTIGO 1	64
APÊNDICE 2 – ARTIGO 2	69

CAPÍTULO 1. REVISÃO DA TESE

1 INTRODUÇÃO GERAL

Physalis peruviana L. (Solanaceae) é uma planta herbácea perene amplamente introduzida em todo o mundo, a partir da América do Sul e pertence ao grupo das pequenas frutas. É originária da região andina, mas cultivada nas regiões tropicais e subtropicais de todos os continentes, tendo como seu maior produtor mundial a Colômbia (CABI, 2022).

A espécie tem grande valor nutracêutico e econômico e vem sendo cultivada por agricultores familiares. Muitas propriedades medicinais são atribuídas aos frutos de *P. peruviana*, tais como anti-inflamatório, diurético, anti-séptico, sedativo, analgésico, entre outras (RODRÍGUEZ e RODRÍGUEZ, 2007; SANTOS et al., 2020). Algumas dessas propriedades medicinais estão associadas à capacidade antioxidante dos polifenóis presentes em sua fruta (PUENTE et al., 2011).

A presença de insetos praga e de patógenos nos cultivos de pequenas frutas requer a constante utilização de defensivos agrícolas para impedir ou minimizar os danos gerados (OSHITA; JARDIM, 2012), muitos dos quais são utilizados de forma indevida e prejudicial ao ambiente, além de serem mais caros que produtos biológicos (PÉREZ-GONZALEZ et al., 2021). Recentemente *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) foi relatada causando danos em folhas de fisális no estado do Paraná (BISCHOFF et al., 2021), o que diminui o potencial econômico do plantio pelo impacto causado pela sua alta herbivoria. Pela ausência de inseticidas registrados para seu combate (BRASIL, 2020), agentes de controle biológico podem ser estratégias sustentáveis e de baixo impacto ambiental no manejo integrado dessa praga.

No controle biológico de pragas são empregados insetos predadores, parasitoides, e microrganismos entomopatogênicos, como bactérias, vírus e fungos (HAJEK, DELALIBERA JR, 2010; MOORE, 2021). Além de sua efetividade no biocontrole, esporos de fungos entomopatogênicos (FE) são capazes de promover diminuição na aplicação de agroquímicos, o que reduz danos ambientais e à saúde humana, além de redução de custos no campo (GUPTA e DIKSHIT, 2010). Devido a essa elevada efetividade e ao tempo necessário para registro ser menor que de um

agrotóxico, existe um interesse crescente no desenvolvimento de bioinseticidas formulados a partir de esporos de FE.

Apesar de promissor, não há registro de bioinseticidas formulados a partir de fungos para controle de *L. bilineata* no Brasil (BRASIL, 2020). Nesse contexto, o controle biológico é uma ferramenta a ser considerada para desenvolvimento de estratégias na composição de um Programa de Manejo Integrado para essa praga.

A presente tese está dividida em três capítulos, sendo que o primeiro capítulo contempla uma revisão da literatura, o segundo capítulo relata a presença de *L. bilineata* em cultivos de *P. peruviana* no sul do Brasil e no terceiro capítulo estão apresentados os bioensaios de patogenicidade de isolados de *B. bassiana* contra o inseto praga em estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e avaliar o potencial de fungos entomopatogênicos contra o inseto praga *Lema bilineata*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar, conhecer e realizar o primeiro relato de *Lema bilineata* causando danos em plantas de *Physalis peruviana* no Brasil;

Isolar fungos entomopatogênicos de insetos mortos com sinais de extrusão fúngica;

Identificar os fungos a nível de espécie por caracterização molecular;

Avaliar as linhagens em testes de mortalidade contra ovos e adultos de *L. bilineata* em condições controladas de laboratório.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico consiste na utilização de inimigos naturais com objetivo de diminuir a densidade populacional de pragas (VAN LENTEREN et al., 2018). Esta técnica de controle é frequentemente utilizada quando espécies exóticas se estabelecem em novas áreas. Acredita-se que o aumento da população do inseto praga esteja relacionado à ausência de inimigos naturais (HAJEK; DELALIBERA JR, 2010).

O controle biológico apresenta vantagens ambientais e econômicas em relação ao uso de inseticidas químicos. A utilização de agentes biológicos se destaca pela alta especificidade quanto ao alvo, sem interferir no desenvolvimento de insetos benéficos (VAN LENTEREN, 2012), além de apresentar impacto imediato e permanecer no ambiente, o que contribui no alcance de níveis de equilíbrio entre pragas e seus parasitoides, predadores e microrganismos a médio e longo prazo.

A aplicação do controle biológico é uma alternativa aos pesticidas químicos para o manejo de pragas e patógenos, cujo uso indiscriminado pode prejudicar o meio ambiente, na contaminação de alimentos, água, animais e solo, redução da biodiversidade, resistência de pragas e fungos e intoxicação, além de prejudicar a saúde humana (EMBRAPA, 2019; ELNAHAL et al., 2022).

Existem três principais conceitos de controle biológico: natural, aplicado e o clássico (PARRA et al., 2002; VAN LENTEREN et al., 2018; PARRA et al., 2021). O controle biológico natural refere-se aos inimigos que habitam o ecossistema, responsáveis pela mortalidade natural das pragas no ambiente. O controle biológico aplicado aborda a criação em massa em laboratório do agente biológico para liberação em grande quantidade do organismo no ambiente (PARNELL et al., 2016). Já o controle biológico clássico é a introdução intencional de um agente de controle biológico exótico para estabelecimento permanente e de longo prazo de controle de pragas (EILENBERG; HAJEK, 2001).

Os programas de controle biológico de pragas podem ser realizados com insetos predadores, parasitoides ou microrganismos, como bactérias, vírus ou fungos entomopatogênicos (MOORE, 2021). Esta técnica utiliza a inserção de inimigos naturais das pragas, sendo inofensiva ao meio ambiente e ao consumidor

final e pode ser utilizada em campo e em pós-colheita (FARBO et al., 2018; EMBRAPA, 2019).

O controle biológico é umas das técnicas do MIP, que é um conjunto de medidas que visa manter o nível populacional de pragas abaixo do nível de dano econômico, buscando a redução na aplicação de insumos sintéticos, como os agrotóxicos (STENBERG, 2017; RADY et al., 2019). Outras técnicas utilizadas além da biológica são a cultural, mecânica, comportamental e química (PARRA et al., 2002; BRYAN e REAY-JONES, 2020).

3.2 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Os fungos entomopatogênicos são capazes de infectar e causar doença em insetos e artrópodes e estão comumente relacionados ao controle natural de muitas pragas (PELL; HANNAM e STEINKRAUS, 2010). Essa característica faz dos FE ideais para o uso como agentes de controle biológico (HAJEK; DELALIBERA JR, 2010).

Esses microrganismos apresentam várias etapas no desenvolvimento de infecções fúngicas (QUESADA-MORAGA; HERRERO; ZABALGOGEAZCOA, 2014). O fungo infecta o hospedeiro por penetração direta da cutícula ou orifícios naturais. O esporo adere à cutícula e germina, produzindo um tubo germinativo que permite a penetração no hospedeiro graças à pressão física e à produção de enzimas extracelulares. Uma vez que o fungo penetra o hospedeiro, passa a colonizar a hemocele, causando a depleção de nutrientes, invasão de tecidos e órgãos, asfixia devido às toxinas secretadas e, finalmente, a morte do inseto. Então, o fungo esporula e emerge, podendo infectar novos insetos (MOONJELY; BARELLI e BIDOCHKA, 2016).

Os fungos entomopatogênicos são os maiores agentes biocontroladores microbianos comercialmente utilizados no Brasil (JORDAN et al., 2021). Biopesticidas à base de FE como *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* e *Isaria*, já estão disponíveis comercialmente, mas não há registro de nenhum para uso específico na cultura do fisális (GONZALEZ et al., 2016; BRASIL, 2020; MANN e DAVIS, 2021; BRASIL, 2022).

3.3 O GÊNERO *Beauveria*

O gênero *Beauveria* é cosmopolita e foi um dos primeiros fungos entomopatogênicos descobertos. A elucidação do papel de *Beauveria*, como causa da muscardina branca, uma doença que afligiu a indústria europeia do bicho-da-seda *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) nos séculos 18 e 19, iniciou o estudo da patologia fúngica em insetos (REHNER et al., 2011). *Beauveria* é também um gênero de patógenos naturais importante e seus hospedeiros incluem muitos insetos praga economicamente importantes (VEGA et al., 2009; HARITH-FADZILAH, GHANI e HASSAN, 2020).

Beauveria bassiana é um dos agentes patogênicos mais importantes que afetam os insetos. É um parasita facultativo, que pode crescer tanto no hospedeiro como permanecer em vida livre. É considerado um fungo cosmopolita por explorar uma variedade de ambientes, podendo viver como saprófito no solo, como endófito em plantas, ou como um entomopatógeno (BOOMSMA et al., 2014).

REFERÊNCIAS

- BISCHOFF, A.M.; FURUIE, J.L.; BENATTO, A.; ZIMMERMANN, R.C.; ARAUJO, E.S.; BAENA, R.; DE OLIVEIRA, M.C.H.; ZAWADNEAK, M.A.C. First report of *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) damaging *Physalis peruviana* (L.) in Brazil. **Ciência Rural**, 51, e20200735, 2021.
- BOOMSMA, J.J.; JENSEN, A.B.; MEYLING, N.V.; EILENBERG, J. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. **Annual Review of Entomology**, v.59, p.467–485, 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 21 Fev 2020.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 14 Jan 2022.
- BRYANT, T.; REAY-JONES, F.P.F. Integrated Pest Management: Concepts and Strategies. Clemson (SC): Clemson Cooperative Extension, Land-Grant Press by Clemson Extension; May. **LGP** 1051, 2020. <https://lgpress.clemson.edu/publication/integrated-pest-management-concepts-and-strategies/>.
- CABI – Invasive species compendium. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/40713>. Acesso em: 26 Fev 2022.
- EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **BioControl**, v.46, p.387-400, 2001.
- ELNAHAL, A.S.M.; EL-SAADONY, M.T.; SAAD, A.M. et al. The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. **European Journal of Plant Pathology**, 2022.
- EMBRAPA. Sobre o Tema. Controle Biológico. Brasília, 2019. Acesso: 5 mar. 2019.
- FARBO, M.G.; URGEGHE, P.P.; FIORI, S.; MARCELLO, A.; OGGIANO, S.; BALMAS, V.; HASSAN, Z.U.; JAOUA, S.; MIGHELI, Q. Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin a- producing *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.284, p. 1-10, 2018.
- GONZALEZ, F.; TKACZUK, C.; DINU, M.M.; FIEDLER, Z.; VIDAL, S.; ZCHORIFEIN, E.; MESSELINK, G.J. New opportunities for the integration of microorganisms into biological pest control systems in greenhouse crops. **Journal of Pest Science**, v.89, n.2, p.295-311, 2016.

GUPTA, S.; DIKSHIT, A.K. Biopesticides: An Ecofriendly Approach for Pest Control. **Journal of Biopesticides**, 1, 186-188, 2010.

HAJEK, A.E.; DELALIBERA JR, I. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. **BioControl**, v.55, p.147-158, 2010.

HARITH-FADZILAH, N.; GHANI, I.A.; HASSAN, M. Omics-based approach in characterizing mechanisms of entomopathogenic fungi pathogenicity: A case example of *Beauveria bassiana*. Journal of King Saud University. **Science**, 2020.

JORDAN, C.; DOS SANTOS, P.L.; OLIVEIRA, L.R.D.S. et al. Entomopathogenic fungi as the microbial frontline against the alien *Eucalyptus* pest *Gonipterus platensis* in Brazil. **Scientific Reports**, 11, 7233, 2021.

MANN, A.J.; DAVIS, T.S. Entomopathogenic fungi to control bark beetles: a review of ecological recommendations. **Society of Chemical Industry**. 77(9), 3841-3846, 2021.

MOONJELY, S.; BARELLI, L.; BIDOCHKA, M.J. Insect pathogenic fungi as endophytes. **Advances in Genetics**, v.94, p.107-135, 2016.

MOORE, D.S. Biological control of a phytosanitary pest (*Thaumatotibia leucotreta*): A case study. **IJERPH**. 18(3), 1198, 2021.

OSHITA, D.; JARDIM, I.C.S.F. Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. **Scientia Chromatographica**, v.4, n.1, p.52-76, 2012.

PARNELL, J.J.; BERKA, R.; YOUNG, H.A.; STURINO, J.M.; KANG, Y.; BARNHART, D.M.; DILEO, M.V. From the lab to the farm: an industrial perspective of plant beneficial microorganisms. **Frontiers in Plant Science**, 7:1110, 2016.

PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores. São Paulo (SP): Editora Manole, 2002.

PARRA, J.R.P.; GEREMIAS, L.D.; BERTIN, A.; COLMENAREZ, Y.; COELHO JR, A. Small-scale rearing of *Anagasta kuehniella* for *Trichogramma* production. 2nd edition. Wallingford (UK): CABI, 2021.

PELL, J.K.; HANNAM, J.J.; STEINKRAUS, J.J. Conservation biological control using fungal entomopathogens. **Biological Control**, v. 55, p.187–198, 2010.

PÉREZ-GONZALEZ, O.; CANTÚ-BERNAL, S.H.; CARBAJAL-CRUZ, N.N.; AGUIRRE-ARZOLA, V.E. Effect of physical and nutritional conditions on growth and conidial production and virulence of *Beauveria* sp. against Lepidoptera and Coleoptera pests. **Southwestern Entomologist**, 46(3), 647-656, 2021.

PUENTE, L.A. et al. *Physalis peruviana* Linnaeus the multiple properties of a highly functional fruit: a review. **Food Research International**, v.44, p.1733–1740, 2011

QUESADA-MORAGA, E.; HERRERO, N.; ZABALGOGEAZCOA, I. Entomopathogenic and nematophagous fungal endophytes. In: **Advances in Endophytic Research**. Ed.: VERMA, V.C.; GANGE, A.C. New Delhi: Springer India, 2014.

RADY, M.M.; EL-SHEWY, A.A.; SEIF EL-YAZAL, M.A.; ABD EL-GAWWAD, I.F.M. Integrative application of soil P-solubilizing bacteria and foliar nano P improves *Phaseolus vulgaris* plant performance and antioxidative defense system components under calcareous soil conditions. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 23, 1–20, 2019.

REHNER, S.A.; MINNIS, A.M.; SUNG, G.H.; LUANGSA-ARD, J.J.; DEVOTTO, L.; HUMBER, R.A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v.103, p.1055-1073, 2011.

SANTOS, G.C. et al. Polyploidy induction in *Physalis alkekengi*. **Bioscience Journal**, v.36, n.3, p.827-835, 2020.

STENBERG, J.A. A conceptual framework for integrated pest management. **Trends in Plant Science**, v.22, n.9, p.759-769, 2017.

VAN LENTEREN, J.C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, v.57, p. 1-20, 2012.

VAN LENTEREN, J.C.; BOLCKMANS, K.; KÖHL, J.; RAVENSBERG, W.J.; URBANEJA, A. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**. 63:39-59, 2018.

VEGA, F.E.; GOETTEL, M.S.; BLACKWELL, M.; CHANDLER, D.; JACKSON, M.A.; KELLER, S.; KOIKE, M.; MANIANIA, N.K.; RANGEL, D.E.N.; ROY, H.E. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v.2, p.149-159, 2009.

CAPÍTULO 2. PRIMEIRO RELATO DE *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) CAUSANDO DANO EM *Physalis peruviana* L. NO BRASIL

RESUMO

O fisális, *Physalis peruviana* L., é uma cultura com potencial de expansão no Brasil, portanto a identificação de espécies fitófagas que causam danos nesta cultura, torna-se importante para o desenvolvimento de um controle preventivo e de estratégias para o Manejo Integrado de Pragas. Neste estudo, relatamos a ocorrência de *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) no cultivo de *P. peruviana* e descrevemos os danos causados por suas larvas e adultos. Observou-se que o número de indivíduos de *L. bilineata*, tanto larvas como adultos, influenciaram significativamente o consumo total em folhas de *P. peruviana*. Além disso, relatamos pela primeira vez a presença de três inimigos naturais, incluindo um fungo (Hypocreales: Cordycipitaceae), uma mosca (Diptera: Tachinidae) e uma formiga (Hymenoptera: Formicidae), associados a esta praga no Brasil, que poderiam ser utilizados como agentes de controle biológico.

Palavras-chave: Fisális, Fungos entomopatogênicos, Inimigos naturais.

ABSTRACT

Increased production of the cape gooseberry, *Physalis peruviana* L. in Brazil has given rise to interest in identifying the phytophagous species that might damage this crop to inform preventive control and integrated pest management strategies. In this study, we report the occurrence and describe the damage that larvae and adults of *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) cause in *P. peruviana*. The number of *L. bilineata* individuals, both larvae and adults, significantly affected the total consumption of *P. peruviana* leaves. We also report, for the first time, three natural enemies, including a fungus (Hypocreales: Cordycipitaceae), a fly (Diptera: Tachinidae), and an ant (Hymenoptera: Formicidae), which are associated with this pest in Brazil and may play a role in biological control strategies.

Key words: Cape gooseberry, Entomopathogenic fungi, Natural enemies.

1 INTRODUÇÃO

O fisális, *Physalis peruviana* L. (Solanaceae), é nativo da região andina e é cultivado comercialmente no Brasil (MUNIZ et al., 2014) devido a seus benefícios farmacológicos e nutricionais (SANTOS et al., 2020). Também se tornou uma alternativa atraente para os pequenos agricultores, que buscam diversificar suas plantações, devido ao alto valor agregado de seus frutos e seus baixos custos de cultivo (PUENTE et al., 2011).

Artrópodes pragas podem limitar a produção de *P. peruviana*. A identificação e o estudo de espécies pragas são importantes para o desenvolvimento de estratégias de controle eficazes (AFSAH, 2015). No Brasil, as principais pragas que têm sido relatadas atacando *P. peruviana* são: *Aphis* sp. Glover (Hemiptera: Aphididae), *Edessa rufomarginata* De Geer (Heteroptera: Pentatomidae), *Phthia picta* (Drury) (Hemiptera: Coreidae), *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), *Epitrix* sp. (Coleoptera: Chrysomelidae), *Manduca sexta* (Cramer) (Lepidoptera: Sphingidae) (RUFATO et al., 2008), *Edessa mediatubunda* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae) (KRINSKI, 2013) e *Tetranychus ludeni* (Acari: Tetranychidae) (ALVARENGA SOARES et al., 2014).

Na Argentina, *L. bilineata* Germar (Chrysomelidae) foi identificada como outra praga artrópode que ataca esta cultura (BADO et al., 2000). A *Lema bilineata* é um inseto desfoliador que se alimenta de plantas hospedeiras da família Solanaceae (MONTI et al., 2020). Causa danos econômicos consideráveis durante suas fases larval e adulta até no tabaco *Nicotiana tabacum* L. (ORMEÑO et al., 2002; BENNETT et al., 1999), em *Physalis viscosa* L. (STEVENS et al., 2010) e *P. peruviana* (BADO et al., 2000; SERVIZIO FITOSANITARIO REGIONALE, 2017). As espécies do gênero *Lema* têm sido relatadas no Brasil desde os anos 50 (COSTA LIMA, 1955), onde inicialmente não eram consideradas pragas. Mais tarde, foi relatado que insetos deste gênero causavam danos às plantas de milho, *Zea mays* L., no Distrito Federal (LAUMANN et al., 2004) e *Acnistus breviflorus* Sendtn. (Solanaceae) no estado do Rio Grande do Sul (PINHEIRO e GRAZIA, 2013).

Este estudo documenta, pela primeira vez, a presença de *L. bilineata* em *P. peruviana* cultivada no Brasil, representando uma extensão de sua distribuição geográfica. Examinamos o consumo foliar em larvas e adultos de *L. bilineata* e

observamos a presença de três inimigos naturais associados a esta espécie. Estes aspectos básicos são essenciais para o controle da incidência da praga.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e Criação de *L. bilineata*

Entre novembro de 2018 e março 2019, pesquisas de campo em plantações de *P. peruviana* nos municípios de Curitiba (25°25'42"S, 49°16'24"W), Campo Largo (25°27'32"S, 49°31'55"W), e Pinhais (25°23'30"S, 49°07'30"W), todos localizados no estado do Paraná, sul do Brasil, revelaram que muitas plantas haviam sido atacadas por algum tipo de coleóptero.

Dez espécimes deste inseto foram coletados e individualizados em microtubos e enviados para identificação junto ao Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Paraná (UFPR), Curitiba. Os espécimes foram identificados pelo Dr. Germano Henrique Rosado-Neto como sendo da espécie *L. bilineata*.

Amostras foram depositadas na coleção entomológica do Museu Pe. Jesus Santiago Moure (DZUP), localizado também no Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

O restante dos insetos coletado foi mantido no Laboratório de Entomologia Agrícola Professor Angelo Moreira da Costa Lima sob condições controladas (25° ±2°C, 60 ±10% UR e fotoperíodo de 12:12 h [D:N]) e alimentados com folhas de *P. peruviana*, para início da criação.

2.2 Avaliação da Herbivoria de *L. bilineata*

Nós avaliamos a herbivoria de indivíduos de *L. bilineata* usando bioensaios de consumo de lâminas de folhas. Os tratamentos usados para medir o consumo foliar foram diferentes números de larvas de terceiro ínstar e de adultos não sexados com até 48 h de vida. Intactas, folhas de *P. peruviana* livres de agrotóxicos foram colocadas em recipientes de 120 mL de polipropileno após serem desinfetadas com hipoclorito a 2% (uma folha por recipiente). Os tratamentos consistiram em um

número variável (um, três ou cinco) de larvas de terceiro ínstar ou indivíduos adultos *L. bilineata*.

As folhas foram fotografadas antes e depois de 48 h de exposição aos insetos. Dez réplicas de cada tratamento foram realizadas. As estimativas de desfolhação foram expressas como consumo total e individual e como uma porcentagem da perda de área foliar, calculada usando o *software Easy Leaf Area* (EASLOM e BLOOM, 2014).

2.3 Análise Estatística

Uma ANOVA unidirecional foi utilizada para analisar o consumo total e os dados médios de consumo individual, com o número de indivíduos de *L. bilineata* por folha como um fator. A separação média foi realizada utilizando um teste de Tukey. Os testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Levene) foram realizados para verificar as suposições da ANOVA. As análises estatísticas foram concluídas em R versão 3.5.2 (R CORE TEAM, 2019).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

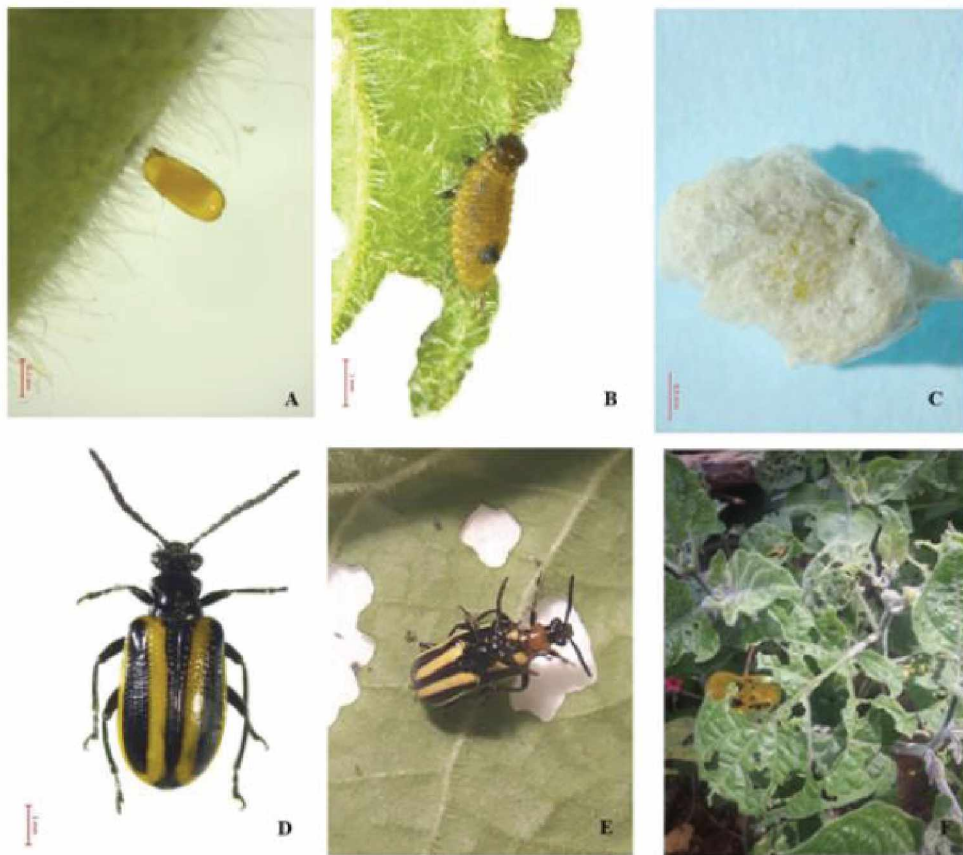
3.1 Coleta e Criação de *L. bilineata*

A duração do ciclo de vida (do ovo ao adulto) de *L. bilineata* sob as condições deste estudo foi de $26,3 \pm 3,7$ dias, o que é consistente com as descobertas de BADO et al (2000). A oviposição de *L. bilineata* geralmente ocorria no lado abaxial das folhas de *P. peruviana* e em padrão isolado. Os ovos (Figura 1A) são amarelos e elípticos, medindo $0,51 \times 0,22$ mm; esta fase durou $4,9 \pm 0,3$ dias. O estágio larval consistiu em quatro ínstars, com duração de 1,9, 1,6, 1,8 e 2,4 dias, do primeiro ao quarto ínstars. As larvas são amarelas escuras e de aproximadamente 6 mm de comprimento no quarto ínstar, com uma cápsula cefálica marrom-escuro a preta (Figura 1B).

A fase pupal do inseto ocorre em casulo branco com aproximadamente 6 mm de comprimento (Figura 1C). O estágio de pupa durou $12,6 \pm 0,9$ dias, o dobro do tempo relatado por BADO et al. (2000). Em adultos, observamos que a coloração do

élitro consistia na alternância de linhas longitudinais amarelo-claro e marrom escuro que se estendiam da base até o ápice (Figura 1D). O pronoto era escuro nos machos e marrom claro nas fêmeas (Figura 1E).

FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DE *Lema bilineata*



FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Estágios de vida de *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) e danos nas folhas de *Physalis peruviana* L.: (A) Ovo; (B) Larva; (C) Casulo; (D) Adulto; (E) Cópula; (F) Folhas de *P. peruviana* danificadas por *L. bilineata*.

Observamos também que as larvas têm um escudo fecal (Figura 1B), que é comum em membros da subfamília Criocerinae e serve como camuflagem e defesa contra predadores, como formigas e cupins (SELMAN, 1988) e parasitoides (OLMSTEAD, 1994).

3.2 Avaliação da Herbivoria em *L. bilineata*

O bioensaio de consumo foliar indicou que larvas e adultos do grupo com o maior número de indivíduos apresentou a maior média total e consumo individual médio (Tabela 1). Este aumento no consumo foliar individual, quando os insetos estão agrupados, juntamente com seu rápido ciclo de vida indica que esta espécie pode causar danos consideráveis em curtos espaços de tempo (NABITY et al., 2009). A presença deste inseto em plantações comerciais de *P. peruviana* poderia, portanto, comprometer a produtividade (Figura 1F) ao longo de todo o ciclo de vida do inseto.

TABELA 1 – Consumo de folhas de *P. peruviana* por diferentes números de larvas de terceiro ínstar e indivíduos adultos de *L. bilineata* após 48 h, sob condições controladas ($25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR, e fotoperíodo de 12:12 h [D:N]). Os dados são apresentados como total e consumo individual médio (cm^2) \pm erro padrão.

ESTÁGIO	FOLHAS	INDIVÍDUOS/FOLHA	CONSUMO TOTAL	%	CONSUMO INDIVIDUAL (MÉDIA)	%
LARVA	10	1	5.3 ± 0.2 a	2.1	0.5 ± 0.2 a	0.2
	10	3	13.1 ± 0.1 b	4.7	0.4 ± 0.0 ab	0.2
	10	5	34.8 ± 0.4 c	13.3	0.7 ± 0.1 b	0.3
			F = 81.88		F = 10.07	
			P < 0.001		P = 0.006	
			df = 2		df = 2	
ADULTO	10	1	5.9 ± 0.1 a	2.4	0.6 ± 0.1 a	0.2
	10	3	21.0 ± 0.2 b	6.2	0.7 ± 0.1 ab	0.2
	10	5	45.1 ± 0.3 c	13.7	0.9 ± 0.1 b	0.3
			F = 113.74		F = 10.39	
			P < 0.001		P = 0.005	
			df = 2		df = 2	

FONTE: O autor (2021).

As letras diferentes na coluna para um determinado estágio de vida indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) no consumo por números variáveis de indivíduos de *L. bilineata* por folha, de acordo com o teste de Tukey. % = Percentual da superfície total da folha; F = valor da ANOVA estatística; P = p-valor; df = graus de liberdade.

Durante a coleta e avaliação de *L. bilineata*, observamos o surgimento de moscas parasitas da família Tachinidae (Diptera) e a predação de larvas por formigas *Pseudomyrmex gracilis* (Hymenoptera: Formicidae: Pseudomyrmicinae), assim como a infecção de adultos por *Beauveria bassiana* (Balsamo) (Hypocreales: Cordycipitaceae).

Espécimes de formiga foram identificados pelo Dr. Rodrigo M. Feitosa, do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Paraná (UFPR), em Curitiba. A identificação do fungo isolado foi realizada de acordo com VICENTE et al. (2008).

O isolado identificado foi depositado na Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense (CMRP-Taxonline) como CMRP4485. Não foi quantificada a abundância desses inimigos naturais no presente estudo; entretanto, eles podem representar alternativas futuras para o controle desta praga, destacando a importância da gestão de agroecossistemas com preservação da biodiversidade da fauna benéfica.

REFERÊNCIAS

- AFSAH, A.F.E. Survey of insects and mite associated Cape gooseberry plants (*Physalis peruviana* L.) and impact of some selected safe materials against the main pests. **Annals of Agricultural Sciences**, Giza, v.60, p.183-191, 2015.
- ALVARENGA SOARES, M. et al. Lesiones de *Tetranychus ludeni* (Acari: Tetranychidae) en el cultivo de *Physalis peruviana* (Solanaceae) en Diamantina, Brasil. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v.40, n.2, p.187-189, 2014.
- BADO, S.G. et al. Aspectos morfológicos, biológicos y de ingesta de *Lema bilineata* G. (Coleoptera: Chrysomelidae) sobre *Physalis peruviana* (Solanaceae). **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, Buenos Aires, v.27, p.5-10, 2000.
- BENNETT, A. et al. A new record of *Lema trilinea* White (Coleoptera: Chrysomelidae) on tobacco in South Africa, with reference to the common pest species, *Lema bilineata* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae, Criocerinae). **African Entomology**, v.7, n.2, p.316–319, 1999.
- COSTA LIMA, A. Coleopteros. In: Insetos do Brasil. Escola Nacional de Agronomia. Rio de Janeiro, V.9, ch.XXIX, p.153-154, 1955.
- EASLON, H.M.; BLOOM, A.J. Easy Leaf Area: Automated digital image analysis for rapid and accurate measurement of leaf area. **Applications in Plant Sciences**, v.2, n.7, 1400033, 2014.
- KRINSKI, D. *Physalis angulata* L. (Solanaceae): a potential hostplant of stink bugs *Edessa mediatubunda* F. (Hemiptera, Pentatomidae). **Biota Neotropica**, Campinas v.13, n.2, p.336-339, 2013.
- LAUMANN, R. et al. Diversidade de crisomelídeos-praga (Coleoptera: Chrysomelidae) no Distrito Federal. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 22p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 76), 2004.
- MONTI, M.M. et al. Morphological and Molecular Characterization of *Lema bilineata* (Germar), a New Alien Invasive Leaf Beetle for Europe, with Notes on the Related Species *Lema daturaphila* Kogan & Goeden. **Insects**, v.11, n.5, p.295, 2020.
- MUNIZ, J. et al. General aspects of *Physalis* cultivation. **Ciência Rural**, v.44, n.6, p.964-970, 2014.
- NABITY, P.D. et al. Indirect suppression of photosynthesis on individual leaves by arthropod herbivory. **Annals of Botany**, v.103, p.655–663, 2009.
- OLMSTEAD, K.L. Waste products as chrysomelid defenses. Department of Biology, University of South Dakota, Vermillion, v.50, p.311-318, 1994.
- ORMEÑO, J. et al. Supervivencia y alimentación comparativa de larvas de *Lema bilineata* Germar en *Datura* spp., tabaco y otras solanáceas. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, v.28, p.21-31, 2002.

PINHEIRO, P.G.; GRAZIA, J. Morfologia e observações comportamentais de duas espécies neotropicais de *Lema* (Coleoptera, Chrysomelidae, Criocerinae). In: XXV Salão de Iniciação Científica - UFRGS, Porto Alegre. Resumos XXV Salão IC-UFRGS. Porto Alegre: UFRGS, 2013.

PUENTE, L.A. et al. *Physalis peruviana* Linnaeus the multiple properties of a highly functional fruit: a review. **Food Research International**, v.44, p.1733–1740, 2011.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019.

RUFATO, L.; RUFATO, A.R.; SCHLEMPER, C.; LIMA, C.S.M.; KRETZSCHMAR, A.A. Aspectos técnicos da cultura da physalis. Lages: CAV/UEDESC; Pelotas: UFPel, 100 p, 2008.

SANTOS, G.C. et al. Polyploidy induction in *Physalis alkekengi*. **Bioscience Journal**, v.36, n.3, p.827-835, 2020.

SELMAN, B.J. Chrysomelids and ants. In: JOLIVET, P. et al. Biology of Chrysomelidae. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht/ Boston/ London, v.42, ch. 27, p.463-474, 1988.

SERVIZIO FITOSANITARIO REGIONALE. *Lema bilineata* (Germar) – Crisomelide sudamericano del tabacco. Assessorato Agricoltura: Regione Campania, Italy, Oct. 02, 2017.

STEVENS, M.M. et al. Detection of *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) in Australia. **General and Applied Entomology**, v.39, p.1-3, 2010.

CAPÍTULO 3. ISOLAMENTO DE LINHAGENS DE *Beauveria* E SEU POTENCIAL COMO AGENTES DE CONTROLE DE *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae)

RESUMO

Lema bilineata Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) foi recentemente relatada causando danos em culturas de *Physalis peruviana* no Brasil. Dado o potencial para causar danos a outras solanáceas e a falta de alternativas para controlar essa praga, foi avaliada a patogenicidade de 15 isolados de *Beauveria* contra adultos de *L. bilineata* *in vitro*. Além disso, três desses isolados foram testados para seu efeito ovicida contra os ovos de *L. bilineata*. Cepas fúngicas foram isoladas de cadáveres mumificados de *L. bilineata* coletados em um campo não comercial no Estado do Paraná, Brasil. Os isolados foram identificados como *Beauveria bassiana* usando marcadores moleculares. Adultos de *L. bilineata* foram suscetíveis a suspensões de esporos de todos estes isolados a uma concentração de 10^8 conidia mL⁻¹. Mortes causadas por fungos foram confirmadas pela extrusão. Três linhagens foram consideradas mais virulentas contra adultos de *L. bilineata* e mostraram efeitos ovicidas. Este é o primeiro estudo sobre fungos entomopatogênicos isolados de insetos mortos coletados de plantações de *P. peruviana* e testados contra *L. bilineata*, realizado no Brasil. Os resultados obtidos em laboratório indicam o alto potencial do uso de três cepas de *B. bassiana* contra *L. bilineata* como agentes biocontroladores.

Palavras-chave: Patogenicidade; Fungos entomopatogênicos; Manejo integrado de pragas; *Physalis peruviana*.

ABSTRACT

Lema bilineata Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) was recently reported to damage *Physalis peruviana* crops in Brazil. Given the potential for inflicting damage on other Solanaceae species and the lack of alternatives for controlling this pest, we assessed the pathogenicity of 15 *Beauveria* isolates against *L. bilineata* adults *in vitro*. In addition, three of these isolates were tested for their ovicidal effect against *L. bilineata* eggs. Fungal strains were isolated from mummified corpses of *L. bilineata* collected in a non-commercial field in Paraná, Brazil. The isolates were identified as *Beauveria bassiana* using molecular markers. *Lema bilineata* adults were susceptible to conidial suspensions of all these isolates at a concentration of 10^8 conidia mL⁻¹. Deaths caused by fungal extrusion were confirmed. Three strains were found to be more virulent against *L. bilineata* adults and showed ovicidal effects. This is the first study on entomopathogenic fungi isolated from dead insects collected from *P. peruviana* crops and tested against *L. bilineata* carried out in Brazil. The results obtained in the laboratory indicate the high potential of the use of three *B. bassiana* strains against *L. bilineata* as a biocontrol agent.

Keywords: Pathogenicity; Entomopathogenic fungi; Integrated pest management; *Physalis peruviana*.

1 INTRODUÇÃO

Lema bilineata Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) é um inseto desfolhador que se alimenta de plantas da família Solanaceae (MONTI et al., 2020). Causa danos econômicos consideráveis durante suas fases larvais e adulta nas culturas de *Physalis peruviana* (L.) no Chile e Argentina (BADO et al., 2000); Itália (SERVIZIO FITOSANITARIO REGIONALE, 2017); e, recentemente, no Brasil (BISCHOFF et al., 2021). Além disso, este coleóptero foi reportado como prejudicial a *Physalis viscosa* (L.) na Austrália (STEVENS et al., 2010), e ao tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) na Argentina e na África do Sul (ORMEÑO, ARAYA e DÍAZ, 2002; BENNET, DU TOIT e BENNET, 1999). Atualmente, não há pesticidas biológicos ou químicos autorizados para controle de *L. bilineata* no Brasil. Os danos causados por este coleóptero em *P. peruviana* e a ausência de pesticidas comerciais, pode levar produtores e técnicos agrícolas a buscar alternativas (BRASIL, 2020), que incluem controles biológicos (BAJA et al., 2020; BISCHOFF et al., 2021).

Neste sentido, a busca na natureza por inimigos naturais, tais como parasitóides, predadores e fungos entomopatogênicos associados a esta espécie de coleóptero é crucial para orientar novas pesquisas sobre organismos com potencial para serem usados em estratégias de controle biológico de conservação ou em programas de controle biológico aplicados (BISCHOFF et al., 2021; ARAUJO et al., 2020a, ARAUJO et al., 2020b).

Uma gama altamente diversificada de fungos entomopatogênicos pode estar naturalmente presente nos agroecossistemas, atuando como reguladores das populações de pragas de artrópodes (AMATUZZI et al., 2018; POITEVIN et al., 2018). Entretanto, devido à alta biodiversidade destes organismos, é importante conhecer a patogenicidade e grau de virulência de uma determinada estirpe fúngica contra uma praga específica (BAJA et al., 2020; THOMAS e ELKINTON, 2004).

Em 2018, durante a coleta de indivíduos de *L. bilineata* em plantações de *P. peruviana* no Estado do Paraná (Brasil), observou-se que adultos de *L. bilineata* adultos estavam infectados por *Beauveria bassiana* ((Balsamo-Crivelli) Vuillemin) (Hypocreales: Cordycipitaceae) (BISCHOFF et al., 2021). Embora fungos entomopatogênicos tenham sido amplamente utilizados contra uma série de insetos pragas, nenhum dado sobre a eficácia desses fungos contra *L. bilineata* está disponível. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo verificar a

patogenicidade de 15 isolados de *B. bassiana* contra adultos e ovos de *L. bilineata* em condições de laboratório. Portanto, este trabalho representa o primeiro passo no aperfeiçoamento de um programa de manejo integrado de pragas (MIP) para esta praga.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Isolamento e Identificação de Fungos Entomopatogênicos

Fungos entomopatogênicos foram isolados de 15 cadáveres de *L. bilineata* encontrados em um cultivo de *P. peruviana* em um campo não comercial em Campo Largo (25°27'09.8" S 49°34'06.4" W), Paraná, Brasil, entre setembro e dezembro de 2019. Os insetos foram individualizados em microtubos estéreis e levados para o laboratório. Posteriormente, cada inseto foi colocado em uma placa de Petri com meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e cloranfenicol e mantidos a $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por cinco dias.

Os isolados fúngicos foram purificados através da seleção de colônias monospóricas, as quais foram transferidas para um meio SDA. A identificação preliminar foi realizada através da análise das características micromorfológicas sob microscópio ótico (400x) após 7 e 14 dias de crescimento (DE HOOG et al., 2020).

Os isolados foram depositados na Coleção Microbiológica da Rede Paranaense - TAXonline (CMRP), Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná (Curitiba, Brasil) (<http://www.splink.org.br>) (acessado em 24 de janeiro de 2020).

2.1.1 Identificação molecular

A extração do DNA genômico e as reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com Vicente e colaboradores (VICENTE et al., 2008). O DNA foi extraído de colônias de cerca de 2 cm³ cultivadas em SDA, transferindo o material biológico para um microtubo de 2 mL contendo 300 µL de brometo de acetiltrimetilamônio (CTAB) e ~80 mg de uma mistura de sílica:celite (2:1). As células foram rompidas manualmente com um pilão estéril durante 5 minutos. Em

seguida, 700 μ L de tampão CTAB foram adicionados e o microtubo foi incubado por 60 minutos a 65°C. Em seguida, 600 μ L de CIA (24:1; clorofórmio: álcool isoamílico) foram adicionados e centrifugados por 10 minutos a 12.000 g. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo no qual 800 μ L de etanol isopropílico 100% gelado foram adicionados, para precipitação do DNA por 45 minutos a 20°C. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 12.000 g e 500 μ L de etanol a 70% frio foi adicionado para lavar o DNA. O pellet foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 100 μ L de água ultrapura. A pureza e integridade do DNA foram avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) e eletroforese usando de gel de agarose 1%. O espaçador interno transcrito (ITS) do rRNA nuclear e o gene do fator de alongamento (*ef-1 α*) foram escolhidos para delimitação de espécies. A amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada usando os *primers* universais ITS1 (5'-TCCGTAGGGTGAACCTGCGG-3'; forward) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATGATGC-3'; reverse) para ITS e EF1 (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3'; forward) e EF2 (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTTT-3'; reverse) para *ef-1 α* . Os mix de reação PCR consistiram em 1 x tampão PCR, 2,0 mM MgCl₂, 25 μ M de deoxinucleosídeos trifosfato (dNTPs), 10 pmol de cada primer, 1 U de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec, Alvorada, Brasil), e 10 ng de gDNA, com um volume final de 12,5 μ L. Reações de PCR foram conduzidas em um termociclador ABI Prism 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), como se segue: 95°C por 4 min.; 35 ciclos a 95°C por 45 s, 55°C por 30 s, e 72°C por 2 min; e um atraso de 72°C por 7 min. Amplificações do ITS e *ef-1 α* foram sequenciadas com o kit de sequenciamento do BigDye Terminator cycle v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com os mesmos primers da PCR e de acordo com as instruções do fabricante, como se segue: 95°C durante 1 min, seguido de 30 ciclos a 95°C por 10 s, 50°C por 5 s, e 60°C por 4 s. As sequências foram analisadas em um sequenciador de DNA Prisma ABI 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

2.1.2 Análise filogenética

Sequências consenso das regiões ITS e ef-1 α foram inspecionadas visualmente usando MEGA v.7 (TAMURA et al., 2013). Inicialmente, cada gene foi analisado separadamente por alinhamentos gerados no software online MAFFT (KATO e TOH, 2008), com cepas de referência de acordo com Rehner et al (2011). Uma análise filogenética foi realizada no MEGA v.7 usando o melhor modelo evolutivo que havia sido previamente estabelecido através do programa, usando o algoritmo de máxima verossimilhança com replicações de 1000 bootstrap. Valores de bootstrap iguais ou maiores que 70% foram considerados estatisticamente significantes.

2.2 Criação de *L. bilineata*

Larvas e adultos de *Lema bilineata* foram coletados em novembro de 2019 de plantas de *P. peruviana* em Pinhais, Paraná, Brasil (25°23'30" S 49°07'30" W). As larvas foram mantidas até a idade adulta, e espécimes adultos foram observados sob um microscópio estereoscópico (Stemi 508, Zeiss; 2,5x) para confirmação da espécie. Os insetos foram criados em laboratório sob condições controladas (25° \pm 1°C, 70 \pm 10% UR, e fotoperíodo 14D:10N) (BISCHOFF et al., 2021). Os adultos eram mantidos em recipientes plásticos de 120 mL com pequenos orifícios para trocas gasosas.

Para alimentação e substrato de oviposição, folhas de *P. peruviana* foram mantidas dentro dos recipientes com seus pecíolos imersos em microtubos cônicos de polipropileno de 2 mL, cheios de água, para evitar a perda de turgor. As folhas com ovos foram transferidas para placas de Petri (9 cm de diâmetro), com seus pecíolos também imersos em microtubos cônicos de 2 mL com água. Quando as larvas atingiram o estágio pré-pupa, eram transferidas para placas de Petri contendo papel filtro umedecido, onde progrediam para o estágio de pupa. Elas permaneceram ali até atingirem a idade adulta, quando eram transferidas para recipientes plásticos.

2.3 Bioensaios de Patogenicidade

2.3.1 Preparo do inóculo

Todos os isolados de *B. bassiana* foram cultivados separadamente em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio SDA e incubados a 28°C por 14 dias. Em seguida, as colônias foram raspadas do meio utilizando-se uma espátula esterilizada e transferidas para frascos de vidro contendo 15 mL de solução salina a 0,85%. (NaCl contendo 0,1% Tween 80).

As suspensões de esporos foram agitadas por 2 min, filtradas e transferidas para tubos de ensaio (30 mL). As suspensões de esporos foram preparadas para cada bioensaio e utilizadas imediatamente após seu preparo. A concentração de esporos foi ajustada para 10^8 esporos mL⁻¹ usando-se um hemocitômetro. A viabilidade dos esporos foi determinada observando-se 100 esporos sob um microscópio ótico (400 x) após 12 h de crescimento em placas de Petri com meio Batata Dextrose Agar. Esporos com um tubo germinativo foram considerados viáveis.

2.3.2 Efeitos dos isolados fúngicos em adultos de *L. bilineata*

As folhas de *Physalis peruviana* foram desinfetadas superficialmente e transferidas para recipientes plásticos de 120 mL (uma folha por recipiente) (BISCHOFF et al., 2021). O desenho experimental foi completamente randomizado. Cada tratamento (isolado fúngico) foi conduzido com cinco replicatas. Dois adultos de *L. bilineata* foram transferidos para cada recipiente, o que foi considerado uma replicata, para um total de 150 indivíduos testados (10 por tratamento). Foi utilizado um aerógrafo Sagyma SW776 (10 lb pol⁻¹) para pulverizar 1 mL da suspensão conidial a uma concentração de $2,17 \times 10^8$ esporos mL⁻¹ e 0,1% Tween[®]80 sobre os indivíduos de *L. bilineata*. O tratamento controle recebeu 1 mL de água destilada esterilizada com 0,1% (v/v) Tween[®]80. Após a pulverização, os recipientes plásticos foram mantidos sob condições controladas (25° ±2°C, 60 ±10% UR, e fotoperíodo de 12:12 h (D:N)).

A mortalidade foi avaliada após um período de sete dias. Os indivíduos moribundos ou aqueles que não responderam ao toque com um pincel foram considerados mortos. Para confirmar o agente causal da morte, estes espécimes tiveram suas superfícies corporais desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,1% (ALVES e PEREIRA, 1998) e foram então transferidos para microtubos estéreis até a extrusão fúngica para verificar a esporulação *post-mortem*.

2.3.3 Efeitos dos isolados fúngicos na viabilidade de ovos de *L. bilineata*

Neste caso, os três isolados de *B. bassiana* que provaram ser mais virulentos contra adultos de *L. bilineata* foram testados em ovos. Um total de 675 ovos de *L. bilineata* foi utilizado para este bioensaio, com cada repetição consistindo em uma folha de *P. peruviana* com 25 ovos de *L. bilineata*.

A metodologia foi semelhante àquela explicada para o bioensaio anterior. Folhas de *P. peruviana* foram desinfetadas superficialmente e colocadas em recipientes plásticos de 120 mL (uma folha por recipiente) (BISCHOFF et al., 2021). O delineamento experimental foi completamente randomizado. Cada tratamento (isolado fúngico) foi conduzido com nove replicatas. Um aerógrafo Sagyma SW776 (10 lb pol⁻¹) foi utilizado para pulverizar 1 mL de suspensão de esporos a uma concentração de $2,04 \times 10^8$ esporos mL⁻¹ e 0,1% Tween[®]80 sobre os ovos de *L. bilineata*. O tratamento controle recebeu 1 mL de água destilada com 0,1% (v/v) Tween[®]80. Após a pulverização, recipientes plásticos foram mantidos sob condições controladas (25° ±2°C, 60 ±10% UR e fotoperíodo de 12:12 h (D:N)). A mortalidade foi avaliada após sete dias. Os ovos secos e não eclodidos foram considerados inviáveis. O bioensaio teve duração de três semanas.

2.4 Análise Estatística

Foram usadas taxas médias de mortalidade (%) para calcular a eficiência fúngica e os tratamentos foram comparados usando teste de Tukey ($p < 0,05$). As taxas de mortalidade foram corrigidas usando a equação de Abbott (ABBOTT, 1925). Os dados foram verificados quanto à normalidade e homocedasticidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento e Identificação de Fungos Entomopatogênicos

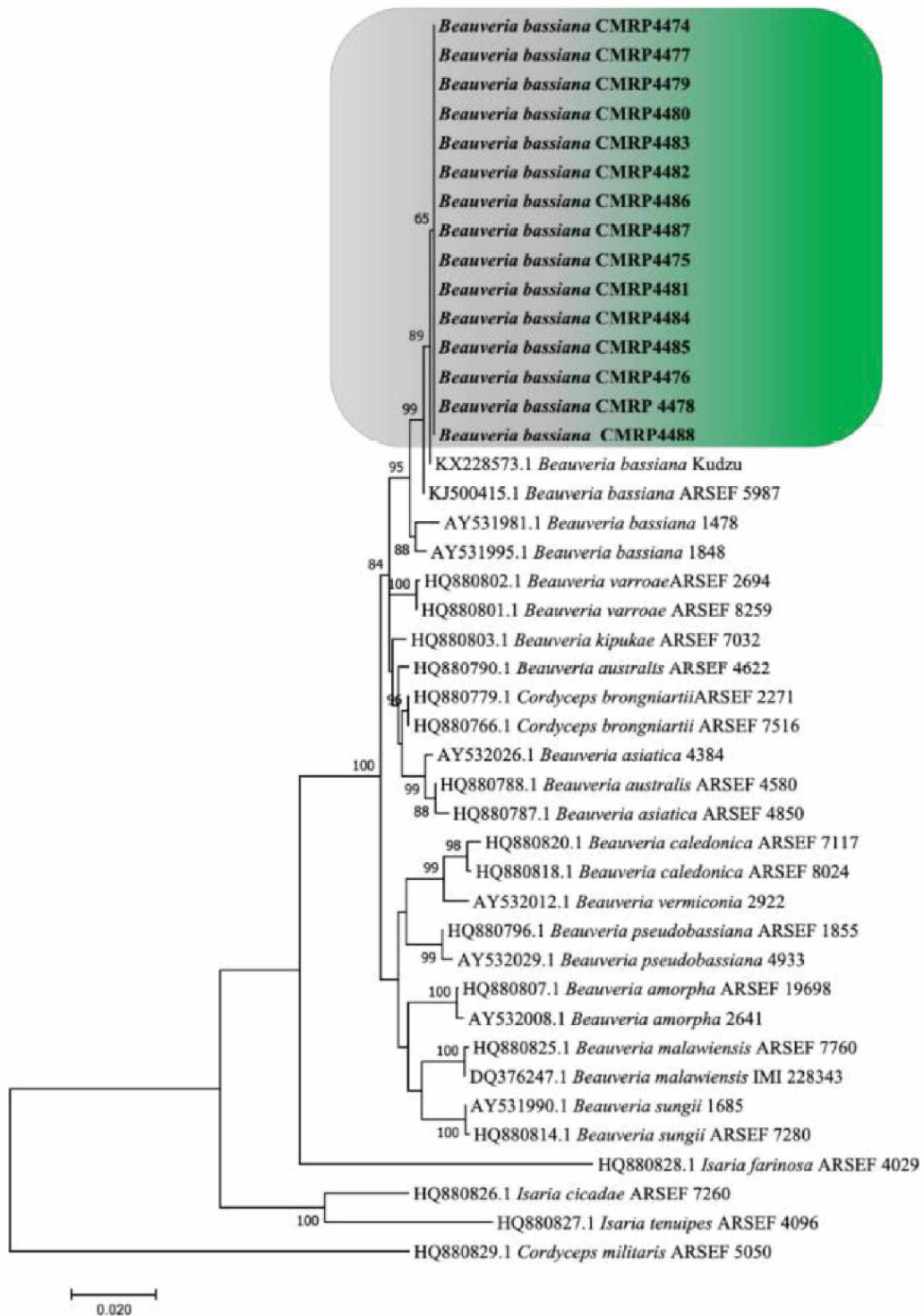
No final, 15 isolados foram morfológicamente identificados como pertencentes ao gênero *Beauveria* e a análise molecular confirmaram que todos os isolados eram *Beauveria bassiana* (Tabela 1).

A árvore filogenética (Figura 1) mostrou que os fungos isolados no presente estudo estavam muito próximos (95%) das linhagens de *B. bassiana* relatadas por Rehner et al. (2011). Além disso, os isolados formaram um clado separado das outras sequências do grupo, embora o bootstrapping tenha suportado ligeiramente este clado (65%). No final, os 15 isolados foram classificados como *B. bassiana* (Figura 1). Estas espécies fúngicas têm características entomopatogênicas e potencial para serem usados como agentes biológicos para o controle de populações de insetos pragas de diferentes culturas, como relatado em vários estudos (BAJA et al., 2020; ARAUJO et al., 2020a; ARAUJO et al., 2020b; AMATUZZI et al., 2018; POITEVIN et al., 2018). Mais investimentos em controle biológico com fungos entomopatogênicos podem contribuir para cultivos sustentáveis, seja como estratégia autônoma ou em apoio a outras estratégias biológicas dentro de um Manejo Integrado de Pragas (ALTINOK, ALTINOK e KOCA, 2018).

TABELA 1 – Isolados fúngicos, identificados como *Beauveria bassiana*, isolados de adultos de *Lema bilineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) coletados em Campo Largo, Paraná, Brasil e seus números de depósito no GENBANK.

ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO		NÚMERO DE ACESSO GENBANK	
	MORFOLÓGICA	MOLECULAR	ITS	ef-1 α
CMRP4474/L1			MZ567032	
CMRP4475/L2			MZ567033	
CMRP4476/L3			MZ567034	
CMRP4477/L4			MZ567035	
CMRP4478/L5			MZ567036	
CMRP4479/L6			MZ567037	
CMRP4480/L7			MZ567038	MZ574443
CMRP4481/L8	<i>Beauveria</i> sp.	<i>B. bassiana</i>	MZ567039	
CMRP4482/L9			MZ567040	
CMRP4483/L10			MZ567041	
CMRP4484/L11			MZ567042	
CMRP4485/L12			MZ567043	
CMRP4486/L13			MZ567044	
CMRP4487/L14			MZ567045	MZ574442
CMRP4488/L15			MZ567046	

FONTE: O autor (2021).

FIGURA 1 – Árvore filogenética de *Lema bilineata*

FONTE: O autor (2022).

LEGENDA: Árvore filogenética de *maximum likelihood* das espécies de *Beauveria* recuperadas no software MEGA 7.0 baseada no alinhamento do espaçador interno transcrito (ITS) e do gene do fator de alongamento 1-alfa ($ef-1\alpha$), usando o modelo Tamura-Nei com sítios invariáveis gama (TN93 + G + I). O suporte do Bootstrap foi calculado a partir de 1000 réplicas. *Cordyceps militaris* ARSEF 5050 foi usado como um grupo externo. Os isolados CMRP destacados isolam um grupo separado das outras linhagens de *Beauveria* incluídos no estudo.

3.2 Efeitos dos Isolados Fúngicos em *L. bilineata*

3.2.1 Testes de patogenicidade em adultos

Os 15 isolados (identificados como CMRP4474-CMRP4488, como indicado na Figura 1) foram utilizados no teste de patogenicidade com adultos de *L. bilineata*. Todos os isolados fúngicos apresentaram crescimento de tubo germinativo após 12 h em meio BDA e foram considerados viáveis com mais de 90% de germinação. Esta primeira triagem para selecionar o entomopatógeno mais eficiente contra *L. bilineata* é um passo crucial para desenvolver estratégias de biocontrole contra esta praga. Com taxas de germinação acima de 90% e um curto tempo de ação (Gráfico 1), os isolados testados são promissores para o controle desta praga.

No estudo atual, os 15 isolados testados mostraram eficácia contra adultos de *L. bilineata*, com taxas de mortalidade variando entre 20% e 80% (Tabela 2). Uma diferença estatística ($p < 0,05$) foi detectada entre as linhagens CMRP4480, CMRP4487 e CMRP4488 e os outros isolados. Estas três linhagens apresentaram a maior patogenicidade (causando 80% de mortalidade) contra adultos de *L. bilineata* (Tabela 2). Em contraste, CMRP4474, CMRP4478 e CMRP4484 apresentaram a menor patogenicidade contra *L. bilineata* (Tabela 2). A variabilidade observada nas taxas de mortalidade é esperada entre os isolados que são testados pela primeira vez (AMATUZZI et al., 2018).

O ciclo de vida dos fungos entomopatogênicos no inseto começa com a germinação do esporo e penetração da cutícula, seguido pela proliferação de hifas, o que acaba matando os hospedeiros. Este ciclo se repete inúmeras vezes, com a produção de esporos infectantes que podem penetrar imediatamente na cutícula de outros indivíduos para repetir o ciclo (ALTINOK, ALTINOK e KOCA, 2019); este processo pode promover a manutenção a médio prazo da presença do entomopatógeno na cultura.

TABELA 2 – Mortalidade de adultos de *L. bilineata* nos bioensaios de patogenicidade.

ISOLADO	MORTALIDADE	
	NÚMERO TOTAL DE ADULTOS DE <i>L. bilineata</i> MORTOS	%
Control	3	0 a
CMRP4474	4	20 a
CMRP4475	8	60 a
CMRP4476	4	40 a
CMRP4477	6	40 a
CMRP4478	6	20 a
CMRP4479	6	60 a
CMRP4480	10	80 b
CMRP4481	8	60 a
CMRP4482	6	40 a
CMRP4483	8	60 a
CMRP4484	4	20 a
CMRP4485	4	40 a
CMRP4486	6	60 a
CMRP4487	10	80 b
CMRP4488	10	80 b

Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas entre isolados, de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,005$).

FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Número total de *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) mortos e taxa de mortalidade ajustada após a inoculação com suspensões de esporos (10^8 esporos.mL⁻¹) de isolados de *Beauveria bassiana*.

Ao todo, 100 insetos morreram no presente experimento. Eles foram individualizados em microtubos estéreis e 76 indivíduos apresentaram extrusão fúngica, confirmando os isolados fúngicos testados como agentes causais da morte (Figura 2a).

FIGURA 2 – Confirmação de agente causal em *Lema bilineata*



FONTE: O autor (2022).

LEGENDA: Fotografias de *Lema bilineata* com sinais de extrusão fúngica: (a) adultos com primeiros sinais de extrusão fúngica; (b) ovos com extrusão fúngica.

3.2.2 Testes de patogenicidade em ovos

Ao realizar o bioensaio anterior usando adultos de *L. bilineata*, sinais de fungos foram observados nos ovos alguns dias após a postura por fêmeas de *L. bilineata* pulverizadas com suspensões de *B. bassiana*. De acordo com estas observações, os isolados de *B. bassiana* CMRP4480, CMRP4487 e CMRP4488, que foram os mais virulentos no bioensaio com indivíduos adultos (Tabela 2), foram testados quanto à sua patogenicidade contra os ovos de *L. bilineata*. Observou-se que entre 58,7% e 66,7% dos ovos não eclodiu após sete dias (Tabela 3). Neste caso, o isolado CMRP4480 foi o mais virulento, sendo significativamente diferente ($p < 0,05$) do restante (Tabela 3).

TABELA 3 – Mortalidade de ovos de *L. bilineata* nos bioensaios de patogenicidade.

ISOLADO	%
Control	6.7 ± 1.8 a
CMRP4480	66.7 ± 1.6 c
CMRP4487	60.0 ± 2.0 b
CMRP4488	58.7 ± 2.4 b

Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas entre isolados fúngicos de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

FONTE: O autor (2022).

LEGENDA: Taxas de mortalidade de ovos de *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) após inoculação com suspensões de esporos (10^8 esporos.mL⁻¹) de três linhagens de *Beauveria bassiana*. Os dados significam as médias dos desvios padrão.

Todos os ovos não eclodidos que foram submetidos à pulverização foram considerados mortos e a taxa de não eclosão no grupo controle foi de apenas 8,8%. A esporulação fúngica foi observada nos ovos que não eclodiram (Figura 2b).

CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo sobre fungos entomopatogênicos isolados de culturas de *P. peruviana* testados contra *L. bilineata*. Todos os 15 isolados fúngicos foram sequenciados e identificados molecularmente e apresentaram diferentes níveis de patogenicidade em condições laboratoriais. Os isolados CMRP4480, CMRP4487 e CMRP4488 induziram as mais altas taxas de mortalidade em adultos e em ovos de *L. bilineata*.

Nossas descobertas no laboratório mostraram que os isolados de *B. bassiana*, como agentes de controle biológico com potencial patogênico contra *L. bilineata*, são uma alternativa promissora aos inseticidas químicos tradicionais que são comumente empregados para tal tarefa. Entretanto, estes resultados devem ser expandidos com experimentos em campo aberto a fim de avaliar a ação dos fungos entomopatogênicos em condições não controladas como um passo adiante no desenvolvimento de melhores abordagens de MIP e seu uso como biopesticidas.

Os dados aqui apresentados podem ajudar a melhorar o desenvolvimento inicial de estratégias de MIP para cultivos de *P. peruviana*, já que não há até o momento nem inseticidas sintéticos disponíveis para o controle específico de *L. bilineata* no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W.S.A. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, 58, 265–267, 1925.
- ALTINOK, H.H.; ALTINOK, M.A.; KOCA, A.S. Modes of action of entomopathogenic fungi. **Current Trends in Natural Sciences**, 8, 117–124, 2019.
- ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In Controle Microbiano de Insetos, 2nd ed.; Alves, S.B., Ed.; FEALQ: Piracicaba, Brazil; pp. 845–869, 1998.
- AMATUZZI, R.F.; POITEVIN, C.G.; POLTRONIERI, A.S.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to soil-borne entomopathogenic fungi. **Insects**, 9, 70, 2018
- ARAUJO, E.S.; POLTRONIERI, A.S.; POITEVIN, C.G.; MIRÓS-AVALOS, J.M.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Compatibility between entomopathogenic fungi and egg parasitoids (Trichogrammatidae): A laboratory study of their combined use to control *Duponchelia fovealis*. **Insects**, 11, 630, 2020a.
- ARAUJO, E.S.; BENATTO, A.; RIZZATO, F.B.; POLTRONIERI, A.S.; POITEVIN, C.G.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Combining biocontrol agents with different mechanisms of action to control *Duponchelia fovealis*, an invasive pest in South America. **Crop Protection**, 134, 105184, 2020b.
- BADO, S.G.; CERRI, A.M.; VILELLA, F.; MOLINA, A. Aspectos morfológicos, biológicos y de ingesta de *Lema bilineata* (Germ) (Coleoptera: Chrysomelidae) sobre *Physalis peruviana* L. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, 26, 5–10, 2000.
- BAJA, F.; POITEVIN, C.G.; ARAUJO, E.S.; MIR S-AVALOS, J.M.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Infection of *Beauveria bassiana* and *Cordyceps javanica* on different immature stages of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). **Crop Protection**, 138, 105347, 2020.
- BENNETT, A.; DU TOIT, C.L.N.; BENNETT, A.L. A new record of *Lema trilinea* White (Coleoptera: Chrysomelidae) on tobacco in South Africa, with reference to the common pest species, *Lema bilineata* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae, Criocerinae): Short Communication. **African Entomology**, 7, 316–319, 1999.
- BISCHOFF, A.M.; FURUIE, J.L.; BENATTO, A.; ZIMMERMANN, R.C.; ARAUJO, E.S.; BAENA, R.; DE OLIVEIRA, M.C.H.; ZAWADNEAK, M.A.C. First report of *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) damaging *Physalis peruviana* (L.) in Brazil. **Ciência Rural**, 51, e20200735, 2021.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit—Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. 2020. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 21 Fev 2020.

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GEN, J.; AHMED, S.; AL-HATMI, A.M.S.; FIGUERAS, M.J.; VITALE, R.G. Atlas of Clinical Fungi, 4th ed.; Utrecht, Universitat Rovira i Virgili: Hilversum, The Netherlands, 2020; Available online: <https://clinicalfungi.org/> (accessed on 21 January 2021).

KATOH, K.; TOH, H. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. **Briefings in Bioinformatics**, 9, 286–298, 2008.

MONTI, M.M.; RUOCCO, M.; GROBBELAAR, E.; PEDATA, A. Morphological and molecular characterization of *Lema bilineata* (Germar), a new alien invasive leaf beetle for Europe, with notes on the related species *Lema daturaphila* Kogan & Goeden. **Insects**, 11, 295, 2020.

ORMEÑO, J.; ARAYA, J.E.; DÍAZ, C.A. Supervivencia y alimentación comparativa de larvas de *Lema bilineata* Germar en *Datura* spp., tabaco y otras solanáceas. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, 28, 21–31, 2002.

PELL, J.K.; HANNAM, J.J.; STEINKRAUS, D.C. Conservation biological control using fungal entomopathogens. **BioControl**, 55, 187–198, 2010.

POITEVIN, C.G.; PORSANI, M.V.; POLTRONIERI, A.S.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Applied Entomology and Zoology**, 53, 323–331, 2018.

REHNER, S.A.; MINNIS, A.M.; SUNG, G.; LUANGSA-ARD, J.; DEVOTTO, S.; HUMBER, R.A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, 103, 1055–1073, 2011.

SERVIZIO FITOSANITARIO REGIONALE. *Lema bilineata* (Germar)—Chrysomelidae Sudamericano del Tabaco. Assessorato Agricoltura: Regione Campania, Italy. 2017. Available online: <http://agricoltura.regione.campania.it/difesa/lema-bilineata.html> (accessed on 21 May 2020).

STEVENS, M.M.; STANTON, R.A.; WU, H.; SAMPSON, B.; WEIR, T.A.; REID, C.A.M.; MO, J. Detection of *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) in Australia. **General and Applied Entomology**, 39, 1–3, 2010.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, 30, 2725–2729, 2013.

THOMAS, S.R.; ELKINTON, J.S. Pathogenicity and virulence. **Journal of Invertebrate Pathology**, 85, 146–151, 2004.

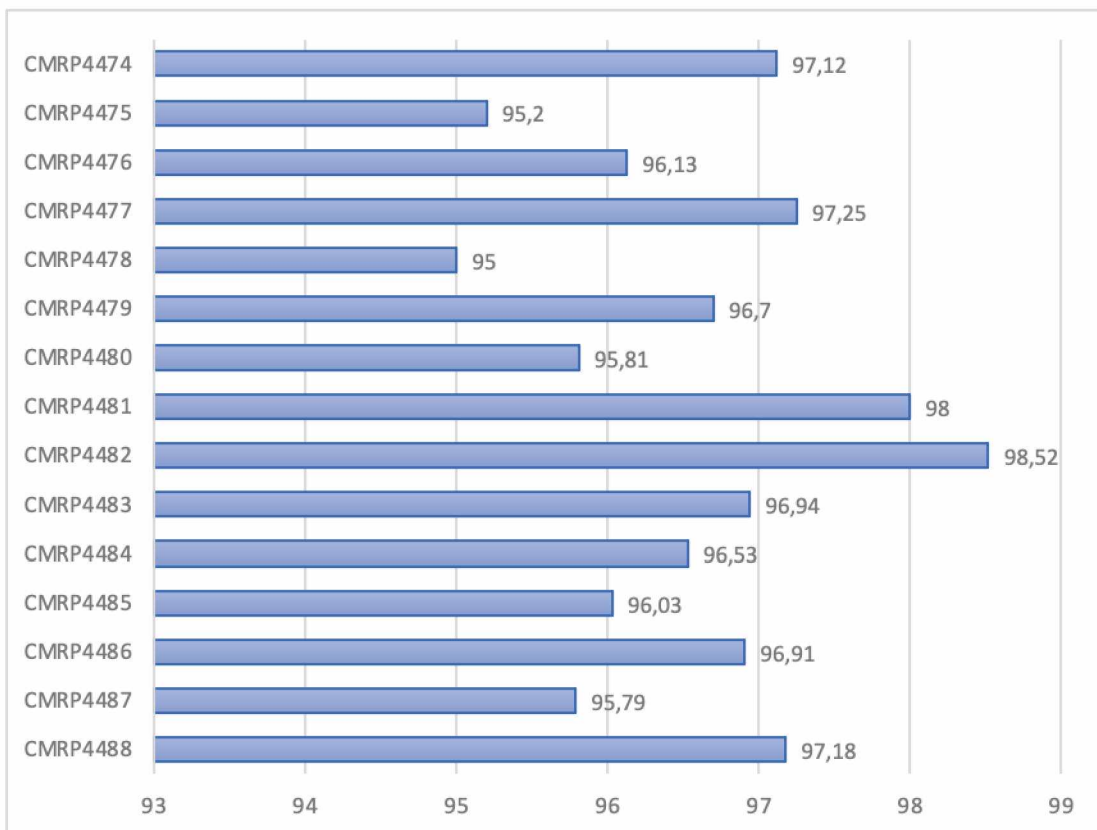
VICENTE, V.A.; ATTILI-AGELIS, D.; PIE, M.R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, M.; NAJAFZADEH, M.J.; DE HOOG, G.S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, 61, 137–144, 2008.

MATERIAL SUPLEMENTAR

As suspensões de esporos de cada isolado utilizado nos bioensaios tiveram suas taxas de germinação avaliadas previamente. A concentração de cada suspensão foi ajustada para 10^6 esporos⁻¹ com auxílio de um hemocitômetro.

A viabilidade dos esporos foi determinada observando-se 100 esporos sob microscópio ótico após 12 h de crescimento em placas de petri contendo meio de cultura BDA a 28°C.

GRÁFICO 1 – Viabilidade dos esporos de *Beauveria bassiana*

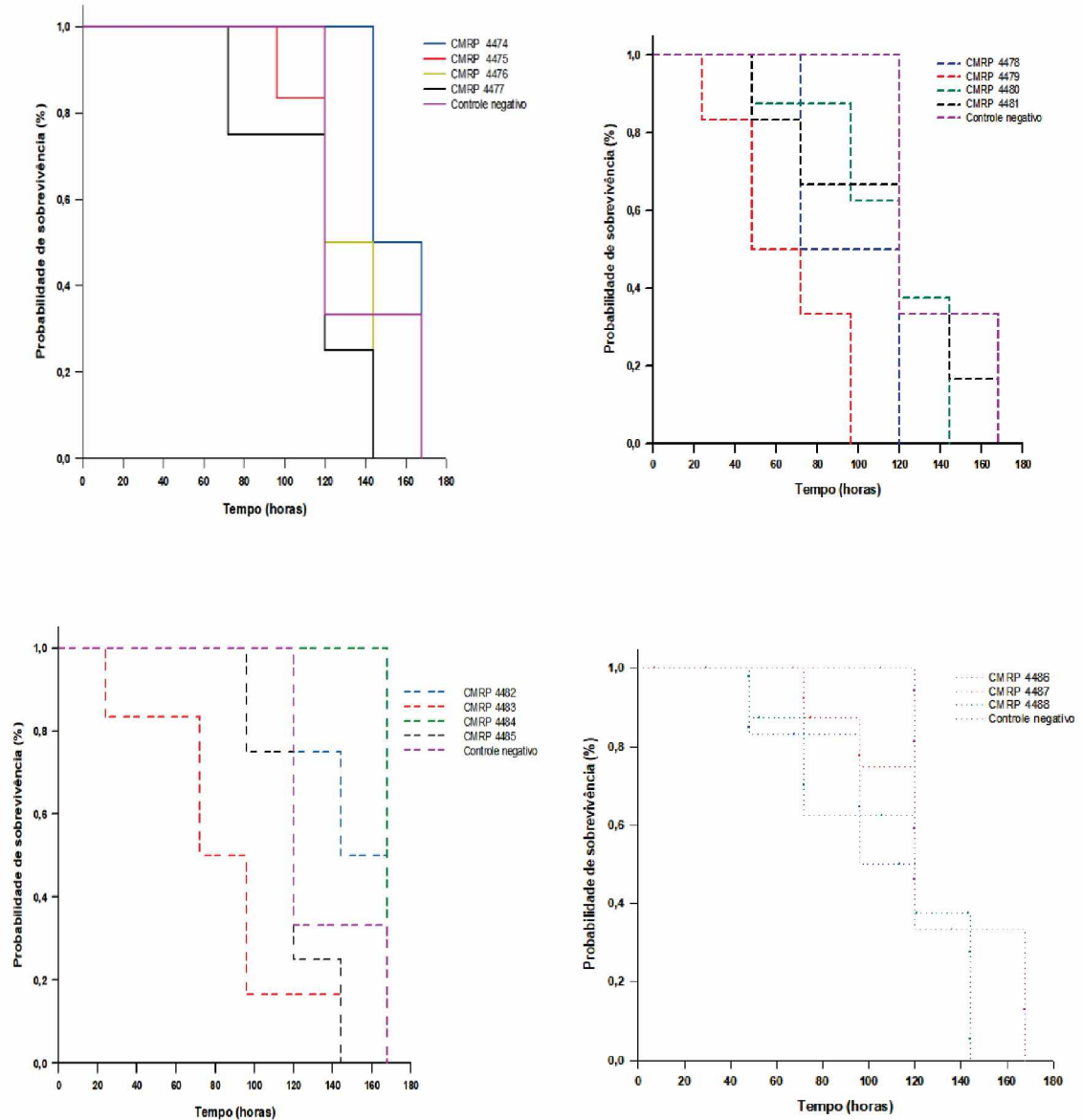


FONTE: O autor (2022).

LEGENDA: Taxa de germinação de todos os isolados (CMRP4474-4488) testados contra *L. bilineata*.

As curvas de sobrevivência de adultos de *L. bilineata* testados nos bioensaios de patogenicidade de *B. bassiana* foram estimadas pelo teste Kaplan-Meier e comparadas usando o teste de log-rank, com o software Sigmaplot 12.0.

GRÁFICO 2 – Curvas de sobrevivência de *Lema bilineata*



FONTE: O autor (2022).

LEGENDA: Curvas de sobrevivência de adultos de *L. bilineata* (horas), após aplicação das suspensões de esporos dos 15 isolados fúngicos testados (CMRP4474-4488).

TABELA 2 – Tempo médio de sobrevivência de adultos de *L. bilineata*

Tratamentos	Taxa de mortalidade (%)	TMS* (IC 95%)	Kaplan-Meier
CMRP 4474	20	156 (132,48 – 179,52)	A
CMRP 4475	60	128 (112,32 – 143,68)	A
CMRP 4476	40	120 (86,73 – 153,26)	A
CMRP 4477	40	114 (84,4 – 143,59)	A
CMRP 4478	20	96 (48,96 – 143,03)	A
CMRP 4479	60	64 (40,74 – 87,25)	A
CMRP 4480	80	114 (90,9 – 137,09)	A
CMRP 4481	60	112 (76,24 – 147,75)	A
CMRP 4482	40	150 (127,48 – 172,51)	A
CMRP 4483	60	84 (52,44 – 115,55)	A
CMRP 4484	20	168 (168 – 168)	A
CMRP 4485	40	120 (100,79 – 139,2)	A
CMRP 4486	60	108 (78,87 – 137,12)	A
CMRP 4487	70	120 (102,22 – 137,77)	A
CMRP 4488	80	108 (81,33 – 134,66)	A
CONTROLE	30	136 (104,64 – 167,35)	A

FONTE: O autor, 2022.

LEGENDA: Tempo médio de sobrevivência (horas) de adultos de *Lema bilineata* expostos a suspensões de esporos, usando o teste Kaplan-Meier. Água destilada autoclavada com Tween®80 foi usada como controle.

DISCUSSÃO GERAL

Algumas ações como uso inadequado ou excessivo de pesticidas, adubação desequilibrada, falta de rotação de culturas, descaso por medidas de controle, entre outros, podem influenciar o aparecimento de pragas em diferentes culturas agrícolas. Portanto, reconhecer cada tipo de inseto é importante para proteger aqueles que são benéficos e controlar, quando necessário, apenas os que são pragas.

Quando falamos em práticas que resultam em bem-estar do produtor e do ambiente, menores perdas econômicas, diminuição no aparecimento de novas pragas e controle de insetos pragas na lavoura, lembramos que existem estratégias além do uso de químicos de amplo espectro. O MIP é capaz de preservar e aumentar os fatores de mortalidade natural, mantendo a população de determinada praga em níveis abaixo daqueles capazes de causar dano econômico ao produtor (DARA, 2019).

O estudo do controle de pragas é extremamente relevante, uma vez que existe uma carência e necessidade de uso de formas alternativas com esse objetivo. Quando se testa novos isolados fúngicos na busca de bons resultados contra determinada praga, o objetivo maior precisa ser a utilização deles no campo, beneficiando diretamente aquele setor que mais precisa dos resultados da pesquisa laboratorial.

Cabe lembrar ainda que certos inseticidas usados para controle de pragas além de contaminarem o ambiente e matarem insetos benéficos, são relativamente caros (PÉREZ-GONZALEZ et al., 2021), reforçando ainda mais a busca por alternativas como o controle biológico.

O gênero *Beauveria* está entre os mais estudados na área de entomopatogênicos, pela sua grande capacidade de colonizar e gerar infecção em diferentes tipos de insetos (JABER e OWNLEY, 2018; DANNON et al., 2020). Assim como o presente estudo, diversos outros trabalhos tiveram como proposta o uso deste gênero na busca de controle de algum inseto praga (WANG et al., 2021).

Os isolados testados neste trabalho apresentaram taxas de germinação acima de 90%, o que também foi relatado para os isolados de *B. bassiana* testados por AMATUZZI et al. (2018).

O trabalho de LIU e BAUER (2006) relata que a maioria dos isolamentos de fungos para controle biológico de insetos é realizada através de insetos infectados e não do solo, como foi o caso do presente estudo.

Foi verificada uma diferença nos valores do tempo médio de sobrevivência dos adultos de *L. bilineata* após a exposição aos esporos de *B. bassiana*, porém tais dados sozinhos não indicaram os fungos mais patogênicos, uma vez que foi verificada a confirmação do agente causal de todos os insetos mortos em experimento.

Neste estudo, os isolados que tiveram mais indivíduos com agente causal de morte confirmada, também apresentaram ação ovicida, sendo que das linhagens testadas, CMRP4480 apresentou 88,24%, CMRP4487 78,03% e CMRP4488 77,46% de não eclosão no teste de patogenicidade em ovos de *L. bilineata* em condições de laboratório.

Além do conhecido uso de fungos entomopatogênicos, como *B. bassiana*, no controle de pragas, estudos recentes têm relatado a capacidade de alguns fungos isolados em meio agrícola, serem usados em biorremediação, por conta de suas características físicas e biológicas (GADD, 2009). Neste trabalho, os três isolados mais patogênicos contra *L. bilineata*, foram testados quanto à tolerância a metais pesados (chumbo e cobre) e apresentaram certa tolerância, o que pode indicar sua capacidade na bioissorção em solos contaminados (VACAR et al., 2021).

As principais propriedades dos metais pesados são os elevados níveis de reatividade e bioacumulação (SOUZA, MORASSUTI e de DEUS, 2018). Tais metais são inseridos no ambiente através de diversas fontes: naturais, agrícolas, industriais, efluentes domésticos, atmosféricas e outras. As fontes de metais pesados no solo agrícola incluem fertilizantes inorgânicos e orgânicos, a calagem, lodo de esgoto, águas de irrigação e pesticidas (SOUZA, MORASSUTI e de DEUS, 2018).

As principais formas de contaminação por cobre estão centradas nos processos industriais e agrícolas (ALLOWAY E AYRES, 1994) e embora os níveis destes metais sejam pequenos em solos agrícolas, o constante uso de fertilizantes de fosfato, durante um longo período, pode ocorrer um acúmulo elevado de alguns destes metais (VERKLEJI, 1993).

A Organização Mundial da Saúde sugere $10 \mu\text{g L}^{-1}$ como limite tolerável de chumbo na água, valor também adotado no Brasil. No caso do cobre, o limite tolerável é de 2 mg L^{-1} (GRIGOLETTO et al., 2012). Metais pesados podem se

acumular nos tecidos vivos ao longo da cadeia alimentar, chegando de forma cumulativa ao ser humano principalmente por meio da alimentação (DUFFUS, 2002; VIRGA, GERALDO e DOS SANTOS, 2007; SOUZA, MORASSUTI e DE DEUS, 2018).

Sendo assim, a presença de fungos capazes de controlar a densidade populacional de uma praga e simultaneamente atuarem na biorremediação de metais pesados em solos agrícolas é algo muito promissor.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de fisális pode sofrer grandes impactos dependendo do nível de infestação por *L. bilineata* no local, uma vez que larvas e adultos causam elevados danos por desfolhação, por conta da sua herbivoria.

Mesmo que *L. bilineata* não conste ainda na listagem de pragas com indicações de inseticidas (BRASIL, 2022), em caso de aparição no campo, produtores que não praticam alguma estratégia do MIP, tendem a escolher métodos de controle rápidos, como o controle químico de amplo espectro, gerando problemas diretos e indiretos ao ambiente.

Por conta dos poucos estudos envolvendo os danos causados em solanáceas por esta praga, em especial de fisális, esta tese foi realizada com objetivo de utilizar fungos entomopatogênicos como agentes de controle de *L. bilineata*, e com sucesso foi possível isolar e identificar 15 linhagens de *B. bassiana*, que apresentaram patogenicidade contra o inseto praga.

No capítulo 2 foi relatado pela primeira vez a ocorrência dessa praga causando danos em *P. peruviana* no Brasil, uma vez que ela já havia sido identificada anteriormente por COSTA LIMA (1955), mas não como um inseto praga. Através da análise da herbivoria de larvas e adultos, concluiu-se que a presença destes insetos na lavoura poderia comprometer diretamente a produtividade das plantas ao longo de todo o ciclo de vida da praga.

No capítulo 3 foi possível confirmar, através de bioensaios de patogenicidade, a capacidade de fungos entomopatogênicos afetarem *L. bilineata* em diferentes níveis e assim, escolher os mais efetivos para se tornarem candidatos para futuros bioensaios em campo, como um importante passo no desenvolvimento de melhores abordagens de MIP a serem implementadas no cultivo de fisális.

Portanto, cada vez mais o uso de estratégias que visem utilizar o controle biológico como parte de um manejo integrado de pragas tem se tornado presente e extremamente relevante no campo, como um pilar principal na busca pela diminuição de insetos praga e aumento dos benefícios para a lavoura e para o ambiente.

RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para um fungo entomopatogênico ser utilizado na formulação de um bioinseticida, é importante antes identificar uma gama de características favoráveis para a sobrevivência, virulência e produção dos esporos.

Como perspectivas, estão testes para verificar a aplicabilidade em campo dos 3 isolados mais patogênicos contra *L. bilineata* (CMRP4480, 4487 e 4488) e ainda, avaliar quantitativamente a presença de chumbo e cobre em amostras líquidas tratadas com os isolados utilizados neste trabalho, por espectroscopia de emissão atômica, a fim de confirmar o potencial biotecnológico desses isolados na biorremediação de metais pesados.

REFERÊNCIAS GERAIS

- ABBOTT, W.S.A. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, 58, 265–267, 1925.
- AFSAH, A.F.E. Survey of insects & mite associated Cape gooseberry plants (*Physalis peruviana* L.) and impact of some selected safe materials against the main pests. **Annals of Agricultural Sciences**, Giza, v.60, p.183-191, 2015.
- ALLOWAY, B.J.; AYRES, D.C. Chemical principles of environmental pollution. 1 ed. **Blackie Academic and Professional**: Glasgow, 1994.
- ALTINOK, H.H.; ALTINOK, M.A.; KOCA, A.S. Modes of action of entomopathogenic fungi. **Current Trends in Natural Sciences**, 8, 117–124, 2019.
- ALVARENGA SOARES, M. et al. Lesiones de *Tetranychus ludeni* (Acari: Tetranychidae) en el cultivo de *Physalis peruviana* (Solanaceae) en Diamantina, Brasil. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v.40, n.2, p.187-189, 2014.
- ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In Controle Microbiano de Insetos, 2nd ed.; Alves, S.B., Ed.; FEALQ: Piracicaba, Brazil; pp. 845–869, 1998.
- AMATUZZI, R.F.; POITEVIN, C.G.; POLTRONIERI, A.S.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to soil-borne entomopathogenic fungi. **Insects**, 9, 70, 2018
- ARAUJO, E.S.; POLTRONIERI, A.S.; POITEVIN, C.G.; MIRÓS-AVALOS, J.M.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Compatibility between entomopathogenic fungi and egg parasitoids (Trichogrammatidae): A laboratory study of their combined use to control *Duponchelia fovealis*. **Insects**, 11, 630, 2020a.
- ARAUJO, E.S.; BENATTO, A.; RIZZATO, F.B.; POLTRONIERI, A.S.; POITEVIN, C.G.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Combining biocontrol agents with different mechanisms of action to control *Duponchelia fovealis*, an invasive pest in South America. **Crop Protection**, 134, 105184, 2020b.
- BADO, S.G.; CERRI, A.M.; VILELLA, F.; MOLINA, A. Aspectos morfológicos, biológicos y de ingesta de *Lema bilineata* (Germ) (Coleoptera: Chrysomelidae) sobre *Physalis peruviana* L. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, 26, 5–10, 2000.
- BAJA, F.; POITEVIN, C.G.; ARAUJO, E.S.; MIR S-AVALOS, J.M.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Infection of *Beauveria bassiana* and *Cordyceps javanica* on different immature stages of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). **Crop Protection**, 138, 105347, 2020.

BENNETT, A.; DU TOIT, C.L.N.; BENNETT, A.L. A new record of *Lema trilinea* White (Coleoptera: Chrysomelidae) on tobacco in South Africa, with reference to the common pest species, *Lema bilineata* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae, Criocerinae): Short Communication. **African Entomology**, 7, 316–319, 1999.

BISCHOFF, A.M.; FURUIE, J.L.; BENATTO, A.; ZIMMERMANN, R.C.; ARAUJO, E.S.; BAENA, R.; DE OLIVEIRA, M.C.H.; ZAWADNEAK, M.A.C. First report of *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) damaging *Physalis peruviana* (L.) in Brazil. **Ciência Rural**, 51, e20200735, 2021.

BOOMSMA, J.J., JENSEN, A.B., MEYLING, N.V., EILENBERG, J. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. **Annual Review of Entomology**, v.59, p.467–485, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit—Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. 2020. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 21 Fev 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 14 Jan 2022.

BRYANT, T.; REAY-JONES, F.P.F. Integrated Pest Management: Concepts and Strategies. Clemson (SC): Clemson Cooperative Extension, Land-Grant Press by Clemson Extension; May. LGP 1051, 2020. <https://lpress.clemson.edu/publication/integrated-pest-management-concepts-and-strategies/>.

CABI – Invasive species compendium. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/40713>. Acesso em: 26 Fev 2022.

CLARKSON, J. M., AND A. K. CHARNLEY. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**, 4: 197-203, 1996.

COSTA LIMA, A. Coleopteros. In: Insetos do Brasil. Escola Nacional de Agronomia. Rio de Janeiro, V.9, ch.XXIX, p.153-154, 1955.

DANNON, H.F.; DANNON, A.E.; DOURO-KPINDOU, O.K. *et al.* Toward the efficient use of *Beauveria bassiana* in integrated cotton insect pest management. **Journal of Cotton Research**, 3, 24, 2020.

DARA, S.K. The new integrated pest management paradigm for the modern age. **Journal of Integrated Pest Management**, 10(1), 2019.

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GEN, J.; AHMED, S.; AL-HATMI, A.M.S.; FIGUERAS, M.J.; VITALE, R.G. Atlas of Clinical Fungi, 4th ed.; Utrecht, Universitat Rovira i Virgili: Hilversum, The Netherlands, 2020; Available online: <https://clinicalfungi.org/> (accessed on 21 January 2021).

DUFFUS, J.H. Heavy metals – A meaningless term? **Pure and Applied Chemistry**, 74(5), 793-907, 2002.

EASLON, H.M.; BLOOM, A.J. Easy Leaf Area: Automated digital image analysis for rapid and accurate measurement of leaf area. **Applications in Plant Sciences**, v.2, n.7, 1400033, 2014.

EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **BioControl**, v.46, p.387-400, 2001.

ELNAHAL, A.S.M.; EL-SAADONY, M.T.; SAAD, A.M. et al. The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. **European Journal of Plant Pathology**, 2022.

EMBRAPA. Sobre o Tema. Controle Biológico. Brasília, 2019. Acesso: 5 mar. 2019.

FARBO, M.G.; URGEGHE, P.P.; FIORI, S.; MARCELLO, A.; OGGIANO, S.; BALMAS, V.; HASSAN, Z.U.; JAOUA, S.; MIGHELI, Q. Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin a-producing aspergillus carbonarius and a. ochraceus. **International Journal of Food Microbiology**, v.284, p. 1-10, 2018.

GADD, G.M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment, **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, vol. 84, no. 1, pp. 13–28, 2009.

GONZALEZ, F.; TKACZUK, C.; DINU, M.M.; FIEDLER, Z.; VIDAL, S.; ZCHORIFEIN, E.; MESSELINK, G.J. New opportunities for the integration of microorganisms into biological pest control systems in greenhouse crops. **Journal of Pest Science**, v.89, n.2, p.295-311, 2016.

GRIGOLETTO, T.L.B.; FUZARI, B.H.; ANDRADE, A.R.; CAMPOS, M.L.A.M. Fatores químicos e físicos que afetam a contaminação por chumbo e cobre em água potável: Uma abordagem para o estudo de caso em química analítica. **Química Nova**, 35(10), 1995-2001, 2012.

GUPTA, S. AND DIKSHIT, A.K. Biopesticides: An Ecofriendly Approach for Pest Control. **Journal of Biopesticides**, 1, 186-188, 2010.

HAJEK, A.E.; DELALIBERA JR, I. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. **BioControl**, v.55, p.147-158, 2010.

HARITH-FADZILAH, N.; GHANI, I.A.; HASSAN, M. Omics-based approach in characterizing mechanisms of entomopathogenic fungi pathogenicity: A case example of *Beauveria bassiana*. *Journal of King Saud University – Science*, 2020.

JABER, L.R.; OWNLEY, B.H. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? **Biological Control**, 116:36–45, 2018.

JORDAN, C.; DOS SANTOS, P.L.; OLIVEIRA, L.R.D.S. *et al.* Entomopathogenic fungi as the microbial frontline against the alien *Eucalyptus* pest *Gonipterus platensis* in Brazil. **Scientific Reports**, 11, 7233, 2021.

KATOH, K.; TOH, H. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. **Briefings in Bioinformatics**, 9, 286–298, 2008.

KRINSKI, D. *Physalis angulata* L. (Solanaceae): a potential hostplant of stink bugs *Edessa meditabunda* F. (Hemiptera, Pentatomidae). *Biota Neotropica*, Campinas v.13, n.2, p.336-339, 2013.

LAUMANN, R. *et al.* Diversidade de crisomelídeos-praga (Coleoptera: Chrysomelidae) no Distrito Federal. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 22p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 76), 2004.

LIU, H.; L. S. BAUER. Susceptibility of *Agilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Economic Entomology**, 99: 1096-1103, 2006.

MANN, A.J.; DAVIS, T.S. Entomopathogenic fungi to control bark beetles: a review of ecological recommendations. **Society of Chemical Industry**. 77(9), 3841-3846, 2021.

MOONJELY, S.; BARELLI, L.; BIDOCHKA, M.J. Insect pathogenic fungi as endophytes. **Advances in Genetics**, v.94, p.107-135, 2016.

MOORE, D.S. Biological control of a phytosanitary pest (*Thaumatotibia leucotreta*): A case study. **IJERPH**. 18(3), 1198, 2021.

MONTI, M.M.; RUOCCO, M.; GROBBELAAR, E.; PEDATA, A. Morphological and molecular characterization of *Lema bilineata* (Germar), a new alien invasive leaf beetle for Europe, with notes on the related species *Lema daturaphila* Kogan & Goeden. **Insects**, 11, 295, 2020.

MUNIZ, J. *et al.* General aspects of *Physalis* cultivation. **Ciência Rural**, v.44, n.6, p.964-970, 2014.

OLMSTEAD, K.L. Waste products as chrysomelid defenses. Department of Biology, University of South Dakota, Vermillion, v.50, p.311-318, 1994.

ORMEÑO, J.; ARAYA, J.E.; DÍAZ, C.A. Supervivencia y alimentación comparativa de larvas de *Lema bilineata* Germar en *Datura* spp., tabaco y otras solanáceas. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, 28, 21–31, 2002.

OSHITA, D.; JARDIM, I.C.S.F. Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. **Scientia Chromatographica**, v.4, n.1, p.52-76, 2012.

- PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores. São Paulo (SP): Editora Manole, 2002.
- PARRA, J.R.P.; GEREMIAS, L.D.; BERTIN, A.; COLMENAREZ, Y.; COELHO JR, A. Small-scale rearing of *Anagasta kuehniella* for *Trichogramma* production. 2nd edition. Wallingford (UK): CABI, 2021.
- PARNELL, J.J.; BERKA, R.; YOUNG, H.A.; STURINO, J.M.; KANG, Y.; BARNHART, D.M.; DILEO, M.V. From the lab to the farm: an industrial perspective of plant beneficial microorganisms. **Frontiers in Plant Sciences**, 7:1110, 2016.
- PELL, J.K.; HANNAM, J.J.; STEINKRAUS, D.C. Conservation biological control using fungal entomopathogens. **BioControl**, 55,187–198, 2010.
- PÉREZ-GONZALEZ, O.; CANTÚ-BERNAL, S.H.; CARBAJAL-CRUZ, N.N.; AGUIRRE-ARZOLA, V.E. Effect of physical and nutritional conditions on growth and conidial production and virulence of *Beauveria* sp. against Lepidoptera and Coleoptera pests. **Southwestern Entomologist**, 46(3), 647-656, 2021.
- PINHEIRO, P.G.; GRAZIA, J. Morfologia e observações comportamentais de duas espécies neotropicais de *Lema* (Coleoptera, Chrysomelidae, Criocerinae). In: XXV Salão de Iniciação Científica - UFRGS, Porto Alegre. Resumos XXV Salão IC-UFRGS. Porto Alegre: UFRGS, 2013.
- POITEVIN, C.G.; PORSANI, M.V.; POLTRONIERI, A.S.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Applied Entomology and Zoology**, 53, 323–331, 2018.
- PUENTE, L.A. et al. *Physalis peruviana* Linnaeus the multiple properties of a highly functional fruit: a review. **Food Research International**, v.44, p.1733–1740, 2011.
- QUESADA-MORAGA, E.; HERRERO, N.; ZABALGOGEAZCOA, I. Entomopathogenic and nematophagous fungal endophytes. In: **Advances in Endophytic Research**. Edição: VERMA, V.C.; GANGE, A.C. New Delhi: Springer India, 2014.
- RADY, M.M.; EL-SHEWY, A.A.; SEIF EL-YAZAL, M.A.; & ABD EL-GAWWAD, I.F.M. Integrative application of soil P-solubilizing bacteria and foliar nano P improves *Phaseolus vulgaris* plant performance and antioxidative defense system components under calcareous soil conditions. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 23, 1–20, 2019.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019.
- REHNER, S.A.; MINNIS, A.M.; SUNG, G.; LUANGSA-ARD, J.; DEVOTTO, S.; HUMBER, R.A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, 103, 1055–1073, 2011.

RUFATO, L.; RUFATO, A.R.; SCHLEMPER, C.; LIMA, C.S.M.; KRETZSCHMAR, A.A. Aspectos técnicos da cultura da *Physalis*. Lages: CAV/UEDESC; Pelotas: UFPel, 100 p, 2008.

SANTOS, G.C. et al. Polyploidy induction in *Physalis alkekengi*. **Bioscience Journal**, v.36, n.3, p.827-835, 2020.

SELMAN, B.J. Chrysomelids and ants. In: JOLIVET, P. et al. Biology of Chrysomelidae. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht/ Boston/ London, v.42, ch. 27, p.463-474, 1988.

SERVIZIO FITOSANITARIO REGIONALE. *Lema bilineata* (Germar)—Chrysomelidae Sudamericano del Tabaco. Assessorato Agricoltura: Regione Campania, Italy. 2017. Available online: <http://agricoltura.regione.campania.it/difesa/lema-bilineata.html> (accessed on 21 May 2020).

SOUZA, A.K.R.; MORASSUTI, C.Y.; de DEUS, W.B. Poluição do ambiente por metais pesados e utilização de vegetais como bioindicadores. **Acta Biomedica Brasiliensia**, 9(3), 95-106, 2018.

STENBERG, J.A. A conceptual framework for integrated pest management. **Trends in Plant Science**, v.22, n.9, p.759-769, 2017.

STEVENS, M.M.; STANTON, R.A.; WU, H.; SAMPSON, B.; WEIR, T.A.; REID, C.A.M.; MO, J. Detection of *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) in Australia. **General & Applied Entomology**, 39, 1–3, 2010.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, 30, 2725–2729, 2013.

THOMAS, S.R.; ELKINTON, J.S. Pathogenicity and virulence. **Journal of Invertebrate Pathology**, 85, 146–151, 2004.

VACAR, C.L.; COVACI, E.; CHAKRABORTY, S.; LI, B.; WEINDORF, D.C.; FRENTIU, T.; PÂRVU, M.; PODAR, D. Heavy metal-resistant filamentous fungi as potential mercury bioremediators. **Journal of fungi**. 7, 386, 2021.

VAN LENTEREN, J.C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, v.57, p. 1-20, 2012.

VAN LENTEREN, J.C.; BOLCKMANS, K.; KÖHL, J.; RAVENSBERG, W.J.; URBANEJA, A. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**. 63:39-59, 2018.

VEGA, F.E.; GOETTEL, M.S.; BLACKWELL, M.; CHANDLER, D.; JACKSON, M.A.; KELLER, S.; KOIKE, M.; MANIANIA, N.K.; RANGEL, D.E.N.; ROY, H.E. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v.2, p.149-159, 2009.

VERKLEJI, J.A. The effects of heavy metals stress on higher plants and their use as bio monitors. In: Markert B (ed) Plant as bioindicators: indicators of heavy metals in the terrestrial environment. New York: VCH, p. 415–424, 1993.

VICENTE, V.A.; ATTILI-AGELIS, D.; PIE, M.R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, M.; NAJAFZADEH, M.J.; DE HOOG, G.S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, 61, 137–144, 2008.

VIRGA, H.H.P.; GERALDO, L.P.; dos SANTOS, F.H. Avaliação de contaminação por metais pesados em amostras de siris azuis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 27(4): 779-785, 2007.

WANG, H.; PENG, H.; LI, W.; CHENG, P. and GONG, M. The Toxins of *Beauveria bassiana* and the Strategies to Improve Their Virulence to Insects. **Frontiers in Microbiology**, 12:705343, 2021.

APÊNDICE 1 – ARTIGO 1

Ciência Rural, Santa Maria, v.51:9, e20200735, 2021

<http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200735>



ISSNe 1678-4596
CROP PROTECTION



First report of *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) damaging *Physalis peruviana* (L.) in Brazil

Adelia Maria Bischoff^{1,2*} Jason Lee Furuie¹ Alessandra Benatto¹
Rubens Candido Zimmermann¹ Emily Silva Araujo¹ Rayne Baena¹
Marcia Cristina Herchovnicz de Oliveira¹ Maria Aparecida Cassilha Zawadneak¹

¹Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná (UFPR), 81531-980, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: adelia_m_@yahoo.com.br.

*Corresponding author.

²Programa de Pós-graduação em Agronomia, Produção Vegetal, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil.

ABSTRACT: Increased production of the Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) in Brazil has given rise to interest in identifying the phytophagous species that might damage this crop to inform preventive control and integrated pest management strategies. In this study, we report the occurrence and describe the damage that larvae and adults of *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) cause in *P. peruviana*. The number of *L. bilineata* individuals, both larvae and adults, significantly affected the total consumption of *P. peruviana* leaves. We also report, for the first time, three natural enemies, including a fungus, a fly, and an ant, which are associated with this pest in Brazil and may play a role in biological control strategies.

Key words: Cape gooseberry, entomopathogenic fungus, natural enemies.

Primeiro relato de *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) causando dano em *Physalis peruviana* (L.) no Brasil

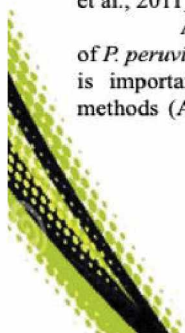
RESUMO: Fisális, *Physalis peruviana* L., é uma cultura em expansão no Brasil, dessa forma a identificação de espécies fitófagas que causam danos nesta cultura é importante para desenvolver controle preventivo e estratégias para o Manejo Integrado de Pragas. Neste estudo, relatamos a ocorrência de *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) no cultivo de *P. peruviana* e descrevemos os danos causados por suas larvas e adultos. Observou-se que o número de indivíduos de *L. bilineata*, tanto larvas como adultos, influenciaram significativamente o consumo total de folhas de *P. peruviana*. Além disso, relatamos pela primeira vez a presença de três inimigos naturais, incluindo um fungo, uma mosca e uma formiga, associados a esta praga no Brasil que poderiam ser utilizados como agentes de controle biológico.

Palavras-chave: Fisális, fungos entomopatogênicos, inimigos naturais.

The Cape gooseberry, *Physalis peruviana* L. (Solanaceae), is native to the Andean region and is commercially grown in Brazil (MUNIZ et al., 2014) due to its pharmacological and nutritional benefits (SANTOS et al., 2020). It has also become an attractive alternative for small farmers seeking to diversify their crops because of the high added value of its fruits and its low costs of cultivation (PUENTE et al., 2011).

Arthropod pests can limit the production of *P. peruviana*. Identifying and studying pest species is important for the design of effective control methods (AFSAH, 2015). In Brazil, the main pests

that have been reported to attack *P. peruviana* are *Aphis* sp. Glover (Hemiptera: Aphididae), *Edessa rufomarginata* De Geer (Heteroptera: Pentatomidae), *Phthia picta* (Drury) (Hemiptera: Coreidae), *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), *Epitrix* sp. (Coleoptera: Chrysomelidae), *Manduca sextapaphus* (Cramer) (Lepidoptera: Sphingidae) (RUFATO et al., 2013), *Edessa mediatubunda* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae) (KRINSKI, 2013), and *Tetranychus ludeni* (Acari: Tetranychidae) (ALVARENGA SOARES et al., 2014). Since very few pest control products have been registered for this crop, pests have thus far been controlled using



cultural practices and natural biological control (MUNIZ et al., 2014).

In Argentina, *Lema bilineata* Germar (*Chrysomelidae*) has been identified as another arthropod pest attacking this crop (BADO et al., 2000). *Lema bilineata* is a defoliating insect that feeds on host plants of the Solanaceae family (MONTI et al., 2020). It causes considerable economic damage during its larval and adult phases to solanaceous crops such as tobacco *Nicotiana tabacum* L., in Argentina (ORMEÑO et al., 2002) and South Africa (BENNETT et al., 1999), and to *Physalis viscosa* L. in Australia (STEVENS et al., 2010), and *P. peruviana* in Argentina (BADO et al., 2000) and Italy (SERVIZIO FITOSANITARIO REGIONALE, 2017).

Species of the genus *Lema* have been reported in Brazil since the 1950s (COSTA LIMA, 1955), where they were not initially considered pests. Later, insects of this genus were reported to cause damage to corn plants, *Zea mays* L., in the Federal District (LAUMANN et al., 2004) and *Acnistus breviflorus* Sendtn. (Solanaceae) plants in the state of Rio Grande do Sul (PINHEIRO & GRAZIA, 2013). This study documents, for the first time, the presence of *L. bilineata* in cultivated *P. peruviana* in Brazil, representing an extension of its geographical distribution. We examined the foliar consumption in larval and adult *L. bilineata* and observed the presence of three natural enemies associated with this species. These basic aspects are essential for controlling the incidence of this pest.

Between November 2018 and March 2019, field surveys in *P. peruviana* plantations in the municipalities of Curitiba (25°25'42"S, 49°16'24"W), Campo Largo (25°27'32"S, 49°31'55"W), and Pinhais (25°23'30"S, 49°07'30"W), all of which are located in the state of Paraná, southern Brazil, revealed that many plants had been attacked by larvae and adults of chrysomelids. Samples of ten specimens of these insects were collected and sent to the Department of Zoology of the Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, for identification. The specimens were identified by Dr. Germano Henrique Rosado-Neto as *L. bilineata*. Samples were deposited in the entomological collection of Pe. Jesus Santiago Moure Museum (DZUP), housed within the Zoology Department of UFPR. The collected insects were kept in the laboratory under controlled conditions (25 ± 2 °C, 60 ± 10% RH, and 12:12 h [L:D] photoperiod) with leaves of *P. peruviana* for rearing.

We evaluated the herbivory of *P. peruviana* individuals using leaf blade consumption bioassays. The treatments used to measure leaf consumption

were different numbers of third-instar larvae and non-sexed adults aged up to 48 h. Intact, pesticide residue-free leaves of *P. peruviana* were placed into 120 mL polypropylene containers after first being disinfected with 2% hypochlorite (one leaf per container). The treatments consisted of a variable number (one, three, or five) of third-instar larvae or adult *L. bilineata* individuals. Leaves were photographed before and after 48 h of exposure to the insects. Ten replicates per treatment were carried out. Defoliation estimates were expressed as total and individual consumption and as a percentage of leaf area loss calculated using Easy Leaf Area software (EASLOM & BLOOM, 2014). A one-way ANOVA was used to analyze total consumption and mean individual consumption data, with the number of *L. bilineata* individuals per leaf as a factor. Mean separation was carried out using a Tukey test. Normality (Shapiro-Wilk) and homogeneity of variances (Levene) tests were performed to check the ANOVA assumptions. Statistical analyses were completed in R version 3.5.2 (R CORE TEAM, 2019).

The duration of the life cycle (from egg to adult) of *L. bilineata* under the conditions of this study was 26.3 ± 3.7 days, which is consistent with findings by BADO et al. (2000). Oviposition of *L. bilineata* usually occurred on the abaxial side of the *P. peruviana* leaves in an isolated pattern. The eggs (Figure 1A) are yellow and elliptical, measuring 0.51 x 0.22 mm; this stage lasted for 4.9 ± 0.3 days. The larval stage consisted of four instars, with a duration of 1.9, 1.6, 1.8, and 2.4 days, from the first to fourth instars. Larvae are dark yellow and approximately 6 mm in length at the fourth instar, with a dark brown to black cephalic capsule (Figure 1B). The insects pupate in a matte white cocoon with approximately 6 mm in length (Figure 1C). The pupa stage lasted for 12.6 ± 0.9 days, twice as long as reported by BADO et al. (2000). In adults, we observed that the coloration of the elytra consisted of alternating bright yellow and dark brown longitudinal lines extending from the base to the apex (Figure 1D). The pronotum was dark in males and light brown in females (Figure 1E). We also observed that the larvae have a fecal shield (Figure 1B). This behavior is common in members of the Criocerinae subfamily, serving as camouflage and defense against predators such as ants and termites (SELMAN, 1988) and parasitoids (OLMSTEAD, 1994).

The leaf consumption bioassay indicated that larvae and adults from the group with the highest number of individuals showed the highest average total and mean individual consumption (Table 1). This increase in individual foliar consumption when

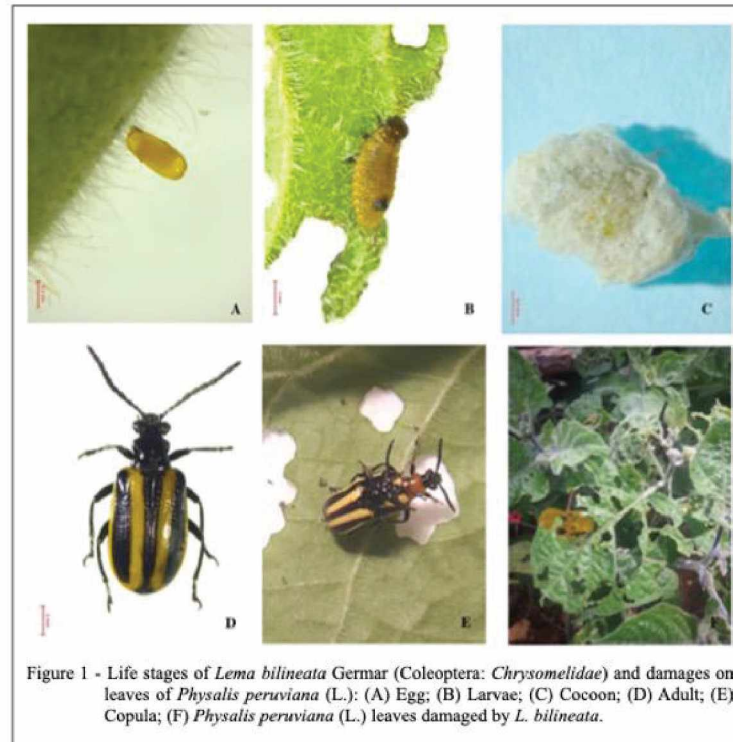


Figure 1 - Life stages of *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) and damages on leaves of *Physalis peruviana* (L.): (A) Egg; (B) Larvae; (C) Cocoon; (D) Adult; (E) Copula; (F) *Physalis peruviana* (L.) leaves damaged by *L. bilineata*.

insects are grouped, along with their rapid life cycle, indicates that this species can cause considerable crop damage in a short time (NABITY et al., 2009). The presence of this insect in commercial plantations of *P.*

peruviana could; therefore, compromise productivity (Figure 1F) throughout the insect's life cycle.

During the collection and evaluation of *L. bilineata* larvae, we observed the emergence of

Table 1 - Consumption of *Physalis peruviana* leaves by different numbers of third-instar larvae and adult individuals of *Lema bilineata* after 48 h under controlled conditions (25 ± 2 °C, $60 \pm 10\%$ RH, and 12:12 h [L:D] photoperiod). Data are given as total and mean individual consumption (cm^2) \pm standard error.

Stage	Number of leaves	Individuals/leaf	Total consumption	%	Average individual consumption	%
Larval	10	1	5.3 ± 0.2 a	2.1	0.5 ± 0.2 a	0.2
	10	3	13.1 ± 0.1 b	4.7	0.4 ± 0.0 ab	0.2
	10	5	34.8 ± 0.4 c	13.3	0.7 ± 0.1 b	0.3
			F = 81.88		F = 10.07	
			P < 0.001		P = 0.006	
			df = 2		df = 2	
Adult	10	1	5.9 ± 0.1 a	2.4	0.6 ± 0.1 a	0.2
	10	3	21.0 ± 0.2 b	6.2	0.7 ± 0.1 ab	0.2
	10	5	45.1 ± 0.3 c	13.7	0.9 ± 0.1 b	0.3
			F = 113.74		F = 10.39	
			P < 0.001		P = 0.005	
			df = 2		df = 2	

Different letters in the column for a given life stage indicate significant differences ($P < 0.05$) in consumption by varying numbers of *L. bilineata* individuals per leaf according to the Tukey test. % = Percentage of the total surface of the leaf; F = value of the ANOVA statistic; P = p-value; df = degrees of freedom.

parasitic flies of the family Tachinidae (Diptera) and the predation of larvae by *Pseudomyrmex gracilis* (Hymenoptera: Formicidae: Pseudomyrmecinae) ants, as well as infection of *L. bilineata* adults by *Beauveria bassiana* (Balsamo) (Hypocreales: Cordycipitaceae). Ant specimens were identified by Dr. Rodrigo M. Feitosa, from the Department of Zoology of the Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba. The identification of the fungal isolate was performed according to VICENTE et al. (2008). The identified isolate was deposited in the Microbiological Collections of the Paraná Network (CMRP-Taxonline) as CMRP4485. We did not quantify the abundance of these natural enemies in the present study; however, they may represent alternatives for controlling this pest, highlighting the importance of managing agroecosystems by preserving the biodiversity of beneficial fauna.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Brasil – Finance code 001, for awarding a Ph.D. scholarship to the first author and to Fundação Araucária (agreement 38/2019) for a research grant to her supervisor. We thank the taxonomists from the Universidade Federal do Paraná (UFPR), Dr. Germano Henrique Rosado-Neto for the identification of the Coleoptera specimens and Dr. Rodrigo M. Feitosa for the identification of the ant specimens.

DECLARATION OF CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

The authors contributed equally to the manuscript.

REFERENCES

- AFSAH, A. F. E. Survey of insects & mite associated Cape gooseberry plants (*Physalis peruviana* L.) and impact of some selected safe materials against the main pests. *Annals of Agricultural Sciences*, Giza, v.60, p.183-191, 2015. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.aos.2015.04.005>>. Accessed: Jun. 12, 2020. doi: 10.1016/j.aos.2015.04.005.
- ALVARENGA SOARES, M. et al. Lesiones de *Tetranychus ludeni* (Acari: Tetranychidae) en el cultivo de *Physalis peruviana* (Solanaceae) en Diamantina, Brasil. *Revista Colombiana de Entomología*, Bogotá, v.40, n.2, p.187-189, 2014. Available from: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882014000200010&lng=en&nrm=iso>. Accessed: May, 19, 2020.
- BADO S. G. et al. Aspectos morfológicos, biológicos y de ingesta de *Lema bilineata* G. (Coleoptera: Chrysomelidae) sobre *Physalis peruviana* (Solanaceae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, Buenos Aires, v.27, p.5-10, 2000. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/28161549_Aspectos_morfologicos_biologicos_y_de_ingesta_de_Lema_bilineata_Germ_Coleoptera_Chrysomelidae_sobre_Physalis_peruviana_L>. Accessed: Jul. 07, 2020.
- BENNETT A. et al. A new record of *Lema trilinea* White (Coleoptera: Chrysomelidae) on tobacco in South Africa, with reference to the common pest species, *Lema bilineata* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae, Criocerinae). *African Entomology*, v.7, n.2, p.316–319, 1999. Available from: <https://journals.co.za/content/ento/7/2/AJA10213589_377>. Accessed: Jun. 05, 2020.
- COSTA LIMA, A. Coleopteros. In: *Insetos do Brasil*. Escola Nacional de Agronomia. Rio de Janeiro, 1955. V.9, ch.XXIX, p.153-154.
- EASLON, H. M.; BLOOM, A. J. Easy Leaf Area: Automated digital image analysis for rapid and accurate measurement of leaf area. *Applications in Plant Sciences*, v.2, n.7, 1400033, 2014. Available from: <<https://doi.org/10.3732/apps.1400033>>. Accessed: May, 30, 2020. doi: 10.3732/apps.1400033.
- KRINSKI, D. *Physalis angulata* L. (Solanaceae): a potential hostplant of stink bugs *Edessa meditabunda* F. (Hemiptera, Pentatomidae). *Biota Neotropica*, Campinas v.13, n.2, p.336-339, 2013. Available from: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-06032013000200033&lng=en&tlng=en>. Accessed: Apr. 29, 2020. doi: 10.1590/S1676-06032013000200036.
- LAUMANN, R. et al. *Diversidade de crisomelídeos-praga (Coleoptera: Chrysomelidae) no Distrito Federal*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 22p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 76). Available from: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/185301/diversidade-de-crisomelideos-praga-coleoptera-chrysomelidae-no-distrito-federal>>. Accessed: Jun. 30, 2020.
- MONTI, M. M. et al. Morphological and Molecular Characterization of *Lema bilineata* (Germar), a New Alien Invasive Leaf Beetle for Europe, with Notes on the Related Species *Lema daturaphila* Kogan & Goeden. *Insects*, v.11, n.5, p.295, 2020. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7290676/>>. Accessed: May, 19, 2020. doi: 10.3390/insects11050295.
- MUNIZ, J. et al. General aspects of *Physalis* cultivation. *Ciência Rural*, v.44, n.6, p.964-970, 2014. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782014005000006>>. Accessed: Apr. 29, 2020. doi: 10.1590/S0103-84782014005000006.
- NABITY, P. D. et al. Indirect suppression of photosynthesis on individual leaves by arthropod herbivory. *Annals of Botany*, v.103, p.655–663, 2009. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2707346/>>. Accessed: Jun. 24, 2020. doi: 10.1093/aob/mcn127.
- OLMSTEAD, K. L. *Waste products as chrysomelid defenses*. Department of Biology, University of South Dakota, Vermillion, v.50, p.311-318, 1994. Available from: <https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-011-1781-4_24>. Accessed: Jun. 25, 2020.

ORMEÑO, J. et al. Supervivencia y alimentación comparativa de larvas de *Lema bilineata* Germar en *Datura* spp., tabaco y otras solanáceas. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, v.28, p.21-31, 2002. Available from: <https://www.miteco.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_plagas/BSVP-28-01-021-031.pdf>. Accessed: May, 19, 2020.

PINHEIRO, P. G.; GRAZIA, J. **Morfologia e observações comportamentais de duas espécies neotropicais de Lema (Coleoptera, Chrysomelidae, Criocerinae)**. In: XXV Salão de Iniciação Científica - UFRGS, Porto Alegre. Resumos XXV Salão IC-UFRGS. Porto Alegre: UFRGS. Available from: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/92718>>. Accessed: Jun. 05, 2020.

PUENTE, L. A. et al. *Physalis peruviana* Linnaeus the multiple properties of a highly functional fruit: a review. **Food Research International**, v.44, p.1733-1740, 2011. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.034>>. Accessed: Jul. 07, 2020. doi: 10.1016/j.foodres.2010.09.034.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019. Available from: <<https://www.R-project.org/>>. Accessed: Jan. 18, 2020.

RUFATO, A. de R. et al. **A cultura da physalis**. In: KRETZCHMAR, A.A. et al. Pequenas Frutas. Florianópolis: UDESC, 2013. Serie Fruticultura, v.2, p.143-193. 2013. Available from: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/108653/1/RUFATO-Cultura-Physalis.pdf>>. Accessed: Jul. 09, 2020.

SANTOS, G. C. et al. Polyploidy induction in *Physalis alkekengi*. **Bioscience Journal**, v.36, n.3, p.827-835, 2020. Available from: <<http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v36n3a2020-47729>>. Accessed: Jun. 16, 2020. doi: 10.14393/BJ-v36n3a2020-47729.

SELMAN, B. J. **Chrysomelids and ants**. In: JOLIVET, P. et al. Biology of Chrysomelidae. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/ Boston/ London, 1988, v.42, ch. 27, p.463-474.

SERVIZIO FITOSANITARIOREGIONALE. **Lema bilineata (Germar) – Crisomelide sudamericano del tabacco**. Assessorato Agricoltura: Regione Campania, Italy, Oct. 02, 2017. Available from: <http://agricoltura.regione.campania.it/difesa/lema_bilineata.html>. Accessed: May, 21, 2020.

STEVENS, M. M. et al. Detection of *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) in Australia. **General and Applied Entomology**, v.39, p.1-3. 2010. Available from: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Detection-of-Lema-bilineata-Germar->>. Accessed: May, 19, 2020.



APÊNDICE 2 – ARTIGO 2



Communication

Isolation of *Beauveria* Strains and Their Potential as Control Agents for *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae)

Jason Lee Furuie ^{1,*}, Andressa Katiski da Costa Stuart ¹, Morgana Ferreira Voidaleski ¹, Maria Aparecida Cassilha Zawadneak ² and Ida Chapaval Pimentel ¹

¹ Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LabMicro), Department of Basic Pathology, Federal University of Paraná, Av. Cel. Francisco H. dos Santos, 100, Curitiba CEP 81530-900, Brazil;

andressa.katiski@gmail.com (A.K.d.C.S.); morganavoidaleski@gmail.com (M.F.V.); ida@ufpr.br (I.C.P.)

² Laboratory of Entomology Professor Ângelo Moreira da Costa Lima, Department of Basic Pathology, Federal University of Paraná, Av. Cel. Francisco H. dos Santos, 100, Curitiba CEP 81530-900, Brazil; mazawa@ufpr.br

* Correspondence: jason.furuie@gmail.com; Tel.: +55-413-361-1573

Simple Summary: The use of fungi as biocontrol agents against insect pests can be an environmentally friendly alternative to the use of chemical pesticides. In this study, 15 fungal strains were isolated and identified as *Beauveria bassiana*, which is a fungus that can harm insects. Consequently, we tested these strains, under laboratory conditions, against adults of *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae), which is an emerging pest in Brazil. These insects showed a great sensitivity to three of the fungal isolates tested. Then, these three fungal strains were applied to the eggs of this insect and showed a rather high ovicidal capacity. Our findings showed that these fungal isolates, which have pathogenic potential as biocontrol agents against *L. bilineata*, are a promising alternative to chemical insecticides. However, these results must be expanded with experiments in open fields.



Citation: Furuie, J.L.; Stuart, A.K.d.C.; Voidaleski, M.F.; Zawadneak, M.A.C.; Pimentel, I.C. Isolation of *Beauveria* Strains and Their Potential as Control Agents for *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insects* **2022**, *13*, 93. <https://doi.org/10.3390/insects13010093>

Received: 8 December 2021

Accepted: 4 January 2022

Published: 14 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) was recently reported to damage *Physalis peruviana* crops in Brazil. Given the potential for inflicting damage on other Solanaceae species and the lack of alternatives for controlling this pest, we assessed the pathogenicity of 15 *Beauveria* isolates against *L. bilineata* adults in vitro. In addition, three of these isolates were tested for their ovicidal effect against *L. bilineata* eggs. Fungal strains were isolated from mummified corpses of *L. bilineata* collected in a non-commercial field in Paraná, Brazil. The isolates were identified as *Beauveria bassiana* using molecular markers. *Lema bilineata* adults were susceptible to conidial suspensions of all these isolates at a concentration of 10^8 conidia mL⁻¹. Deaths caused by fungal extrusion were confirmed. Three strains were found to be more virulent against *L. bilineata* adults and showed ovicidal effects. This is the first study on entomopathogenic fungi isolated from dead insects collected from *P. peruviana* crops and tested against *L. bilineata* carried out in Brazil. The results obtained in the laboratory indicate the high potential of the use of three *B. bassiana* strains against *L. bilineata* as a biocontrol agent.

Keywords: pathogenicity; entomopathogenic fungi; integrated pest management; *Physalis peruviana*

1. Introduction

Lema bilineata Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) is a defoliating insect that feeds on host plants of the Solanaceae family [1]. It causes considerable economic damage during its larval and adult phases in crops of *Physalis peruviana* (L.) in Chile and Argentina [2]; Italy [3]; and, recently, Brazil [4]. Moreover, this Coleoptera has been reported to damage *Physalis viscosa* (L.) in Australia [5], and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in Argentina and South Africa [6,7]. Currently, no authorized biological or chemical pesticides for controlling *L. bilineata* are available in Brazil. The damage caused by this coleoptera on *P. peruviana* and the absence of commercial pesticides have led producers and agricultural technicians to seek

alternatives [8], which include biological controls [4,9]. In this regard, the search in the wild for natural enemies, such as parasitoids, predators, and entomopathogenic fungi, associated with this coleoptera pest species is crucial for guiding new research on organisms with the potential to be used in conservation biological control strategies or applied biological control programs [4,10,11]. A highly diverse range of entomopathogenic fungi can be naturally present in agroecosystems, acting as regulators of arthropod pest populations [12,13]. However, due to the high biodiversity of these organisms, it is important to know the pathogenicity and degree of virulence of a given fungal strain against a specific pest [9,14].

In 2018, during the collection of *L. bilineata* individuals in *P. peruviana* crops in the Paraná state (Brazil), it was observed that *L. bilineata* adults were infected by *Beauveria bassiana* ((Balsamo-Crivelli) Vuillemin) (Hypocreales: Cordycipitaceae) [4]. Although entomopathogenic fungi have been widely used against a number of insect pests, no data on the efficacy of these fungi against *L. bilineata* are available. In this context, the current study aims to verify the pathogenicity of 15 strains of *B. bassiana* against *L. bilineata* adults and eggs under laboratory conditions. Therefore, this work represents the first step in the development of an improved integrated pest management (IPM) program for this pest.

2. Materials and Methods

2.1. Isolation and Identification of Entomopathogenic Fungi

Entomopathogenic fungi were isolated from 15 dead *L. bilineata* adults found in a *P. peruviana* crop in a non-commercial field of Campo Largo (25°27'09.8" S 49°34'06.4" W), Paraná, Brazil, between September and December 2019. The insects were individualized in sterile microtubes and taken to the laboratory. Subsequently, each insect was placed in a Petri dish with Sabouraud Dextrose Agar (SDA) medium and chloramphenicol and kept at 28 ± 1 °C for five days. Fungal isolates were purified by selecting monospore colonies, which were then transferred into an SDA medium. Preliminary identification was performed by analyzing micromorphological characteristics under an optical microscope (400x) after 7 and 14 days of growth [15]. The isolates were deposited in the Microbiological Collection of the Paranaense Network—TAXonline (CMRP), Department of Basic Pathology, Federal University of Paraná (Curitiba, Brazil) (<http://www.splink.org.br>) (accessed on 24 January 2020).

2.1.1. Molecular Identification

The genomic DNA extraction and sequencing reactions were performed according to Vicente et al. [16]. Briefly, DNA was extracted from colonies of about 2 cm³ cultivated in SDA by transferring the biological material to a 2 mL microtube containing 300 µL of cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) and ~80 mg of a silica:celite mixture (2:1). The cells were manually disrupted with a sterile pestle for 5 min. Then, 700 µL of CTAB buffer was added and the microtube was incubated for 60 min at 65 °C. Next, 600 µL of CIA (24:1; chloroform:isoamyl alcohol) was added and centrifuged for 10 min at 12,000 g. The supernatant was collected and transferred to a new tube in which 800 µL of ice-cold 100% isopropyl ethanol was added for DNA precipitation for 45 min at −20 °C. The tubes were centrifuged for 15 min at 12,000 g and 500 µL of cold 70% ethanol was added to wash the DNA. The pellet was dried at room temperature and resuspended in 100 µL of ultrapure water. DNA purity and integrity were evaluated by spectrophotometry (NanoDrop®, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) and electrophoresis using 1% agarose gel.

The internal transcribed spacer (ITS) of the nuclear rRNA and the elongation factor (*ef-1α*) gene were chosen for species delimitation. Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification was performed using the universal primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; forward) and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; reverse) for ITS and EF1 (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3'; forward) and EF2 (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3' reverse) for *ef-1α*. PCR reaction mixes consisted of 1 × PCR buffer, 2.0 mM MgCl₂, 25 µM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 10 pmol of each primer, 1 U of Taq DNA

polymerase (Ludwig Biotec, Alvorada, Brazil), and 10 ng of gDNA, with a final volume of 12.5 μ L. PCR reactions were conducted in an ABI Prism 2720 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), as follows: 95 °C for 4 min; 35 cycles at 95 °C for 45 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 2 min; and a delay at 72 °C for 7 min. Amplicons of ITS and ef-1 α were sequenced with the BigDye Terminator cycle sequencing kit v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the same PCR primers and in accordance with the manufacturer's instructions, as follows: 95 °C for 1 min, followed by 30 cycles at 95 °C for 10 s, 50 °C for 5 s, and 60 °C for 4 s. The sequences were analyzed on an ABI Prism 3700 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.1.2. Phylogenetic Analysis

Consensus sequences of the ITS and ef-1 α regions were visually inspected using MEGA v.7 [17]. Initially, each gene was analyzed separately by alignments generated in the MAFFT online software [18], with reference strains according to Rehner et al. [19]. Then, the alignment of ITS and ef-1 α was concatenated in MAFFT. A phylogenetic analysis was performed in MEGA v.7 using the best evolutionary model that had previously been established through the program, using the maximum likelihood algorithm with 1000 bootstrap replicates. Bootstrap values equal to or greater than 70% were considered statistically significant.

2.2. Rearing of *Lema bilineata* (Coleoptera: Chrysomelidae)

Lema bilineata larvae and adults were collected in November 2019 from *P. peruviana* plants in Pinhais, Paraná, Brazil (25°23'30" S 49°07'30" W). Larvae were kept until adulthood, and adult specimens were observed under a stereoscopic microscope (Stemi 508, Zeiss; 2.5 \times) for species confirmation. Insects were reared in the laboratory under controlled conditions (25 \pm 1 °C, 70 \pm 10% RH, and 14L:10D photoperiod) [4]. The adults were kept in 120 mL plastic containers with small orifices for gas exchange. For feeding and substrate laying, *P. peruviana* leaves were kept inside the containers with their petioles immersed in 2 mL conical bottomed polypropylene microtubes filled with water to prevent turgor loss. Leaves with eggs were transferred to Petri dishes (9 cm in diameter), with their petioles also immersed in 2 mL conical microtubes with water.

The insects were fed ad libitum with *P. peruviana* leaves, which were replaced on a daily basis. When the larvae reached the pre-pupa stage, they were transferred into Petri dishes containing moistened filter paper, where they progressed to the pupa stage. They remained in the Petri dishes until reaching adulthood, when they were transferred to new plastic containers.

2.3. Pathogenicity Assays

2.3.1. Inoculum Preparation

All *Beauveria* isolates were grown separately in Petri dishes (9 cm in diameter) containing SDA medium and incubated at 28 °C for 14 days. Then, conidia were scraped from the medium using a sterile spatula and transferred to glass vials containing 15 mL of 0.85% saline solution (NaCl containing 0.01% Tween[®] 80). Conidia suspensions were vortexed for 2 min, filtered, and transferred to test tubes (30 mL). New conidial suspensions were prepared for each bioassay and used immediately after preparation. The concentration of conidia was adjusted to 10⁸ spores mL⁻¹ using a hemocytometer. Conidial viability was determined before the suspension preparation by observing whether 100 spores could be seen under an optical microscope (400 \times magnification) after 12 h of growth. Conidia with a germ tube were considered viable.

2.3.2. Bioassay: Effects of Fungal Isolates on Adults of *Lema bilineata* (Coleoptera: Chrysomelidae)

Physalis peruviana leaves were disinfected superficially and placed in 120 mL plastic containers (one leaf per container) [4]. The experimental design was completely randomized. Each treatment (fungal isolate) was conducted with five replications. Two *L. bilineata*

adults were transferred to each container, which was considered a replication, for a total of 150 individuals tested (10 per treatment). A Sagyma SW776 airbrush (10 lb pol⁻¹) was used to spray 1 mL of conidial suspension at a concentration of 2.17×10^8 spores mL⁻¹ and 0.1% Tween[®]80 over the *L. bilineata* individuals. The control treatment received 1 mL of sterile distilled water with 0.1% (v/v) Tween[®]80. After spraying, the plastic containers were kept under controlled conditions (25 ± 2 °C, $60 \pm 10\%$ RH, and 12:12 h (L:D) photoperiod). Mortality was assessed after a seven-day period. Moribund individuals or those that did not respond to touch with a paintbrush were considered dead. To confirm the cause of death, these specimens had their body surfaces disinfected in 0.1% sodium hypochlorite solution [20] and were then transferred to sterile microtubes until fungal extrusion to check for postmortem sporulation. The bioassay was carried out for three weeks (with 5 different treatments weekly).

2.3.3. Bioassay: Effects of Fungal Isolates on the Viability of *Lema bilineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) Eggs

In this case, the three *B. bassiana* isolates that proved to be more virulent against *L. bilineata* adults were tested on eggs. A total of 675 *L. bilineata* eggs were used for this bioassay, with each replicate consisting of a *Physalis peruviana* leaf with 25 *L. bilineata* eggs. The methodology was similar to that explained for the former bioassay. *Physalis peruviana* were disinfected superficially and were placed in 120 mL plastic containers (one leaf per container) [4]. The experimental design was completely randomized. Each treatment (fungal isolate) was conducted with nine replications. A Sagyma SW776 airbrush (10 lb pol⁻¹) was used to spray 1 mL of conidial suspension at a concentration of 2.04×10^8 spores mL⁻¹ and 0.1% Tween[®]80 over the *L. bilineata* eggs. The control treatment received 1 mL of sterile distilled water with 0.1% (v/v) Tween[®]80. After spraying, plastic containers were kept under controlled conditions (25 ± 2 °C, $60 \pm 10\%$ RH, and 12:12 h (L:D) photoperiod). Mortality was assessed after seven days. Dry and unhatched eggs were considered dead. The bioassay was carried out for three weeks.

2.4. Statistical Analysis

Mean mortality rates (%) were used to calculate fungal efficiency and the treatments were compared using Tukey's test ($p < 0.05$). Mortality rates were corrected using Abbott's equation [21]. Data were checked for normality and homocedasticity.

3. Results and Discussion

3.1. Isolation and Identification of Entomopathogenic Fungi

In the end, 15 isolates were morphologically identified as belonging to the genus *Beauveria* and the molecular analysis confirmed that all isolates were *Beauveria bassiana* (Table 1).

The phylogenetic tree (Figure 1) showed that the fungi isolated in the current study were in close proximity (95%) with the *B. bassiana* strains reported by Rehner et al. [19]. In addition, the isolated strains formed a separate clade from the other sequences in the group, although bootstrapping slightly supported this clade (65%). In the end, the 15 isolated strains were classified as *B. bassiana* (Figure 1). This fungal species has entomopathogenic characteristics and the potential to be used as a biological agent for controlling insect pest populations of different crops, as reported in several studies [9–13]. Further investment in biological control with entomopathogenic fungi could contribute to sustainable crop production either as a stand-alone strategy or in support of other biological and IPM strategies [22].

Table 1. Fungal strains, identified as *Beauveria bassiana*, isolated from *Lema bilineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) adults collected in Campo Largo, Paraná, Brazil, and their GENBANK accession numbers.

Isolate	Identification		GENBANK Accession Number	
	Morphological	Molecular	ITS	ef-1 α
CMRP4474/L1			MZ567032	
CMRP4475/L2			MZ567033	
CMRP4476/L3			MZ567034	
CMRP4477/L4			MZ567035	
CMRP4478/L5			MZ567036	
CMRP4479/L6			MZ567037	
CMRP4480/L7			MZ567038	MZ574443
CMRP4481/L8	<i>Beauveria</i> sp.	<i>B. bassiana</i>	MZ567039	
CMRP4482/L9			MZ567040	
CMRP4483/L10			MZ567041	
CMRP4484/L11			MZ567042	
CMRP4485/L12			MZ567043	
CMRP4486/L13			MZ567044	
CMRP4487/L14			MZ567045	MZ574442
CMRP4488/L15			MZ567046	

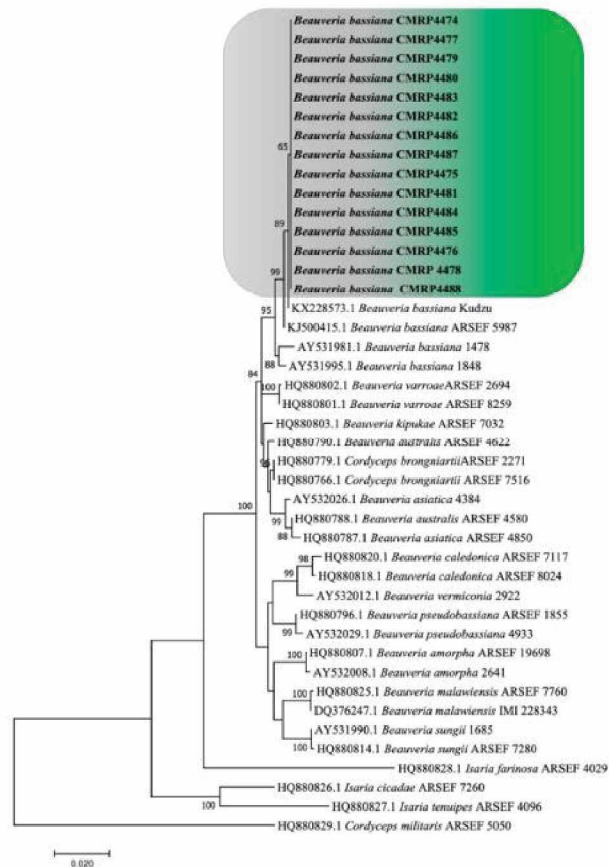


Figure 1. Maximum likelihood phylogenetic tree of the *Beauveria* species recovered in the MEGA 7.0 software based on the concatenated alignment of the transcribed internal spacer (ITS) and the elongation

factor 1-alpha (ef-1 α) gene, using the Tamura-Nei with gamma invariable sites (TN93 + G + I) model. Bootstrap support was calculated from 1000 replicates. *Cordyceps militaris* ARSEF 5050 was used as an outgroup. The highlighted CMRP isolates form a separate group from the other *Beauveria* strains included in the study.

3.2. Pathogenicity Tests against *Lema bilineata*

3.2.1. Pathogenicity Test in *Lema bilineata* Adults

The 15 isolates (identified as CMRP4474–CMRP4488, as indicated in Figure 1) were used in the pathogenicity test with *L. bilineata* adults. All fungal isolates presented germ tube growth after 12 h in an SDA medium and were considered viable with over 90% germination. This first screening for selecting the most efficient entomopathogen against *L. bilineata* is a crucial step for developing biocontrol strategies against this pest. With germination rates above 90% and a short time of action, the tested isolates were promising prospects for the control of *L. bilineata*.

In the current study, the 15 isolates tested showed efficacy against *L. bilineata* adults, with varying mortality rates between 20% and 80% (Table 2). A statistical difference ($p < 0.05$) was detected between the CMRP4480, CMRP4487, and CMRP4488 strains and the other isolates. These three isolated strains showed the highest pathogenicity (causing 80% mortality) against *L. bilineata* adults (Table 2). In contrast, CMRP4474, CMRP4478, and CMRP4484 showed the lowest pathogenicity against *L. bilineata* adults (Table 2). The observed variability in mortality rates is expected among isolates that are tested for the first time [12]. The life cycle of entomopathogenic fungi on the insect begins with spore germination and cuticle penetration, followed by hyphae proliferation, which ends up killing the hosts. This cycle is repeated countless times, with the production of infective spores that can penetrate immediately into the cuticle of other individuals to repeat the cycle [23]; this process may promote the medium-term maintenance of the fungal presence in the crop.

Table 2. Total number of *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) adults dead and adjusted mortality rate after inoculation with conidial suspensions (10^8 conidia mL⁻¹) of isolated *Beauveria bassiana* strains.

Isolate	Mortality	
	Total Number of Dead <i>Lema bilineata</i> Adults	Rate (%)
Control	3	0 a
CMRP4474	4	20 a
CMRP4475	8	60 a
CMRP4476	4	40 a
CMRP4477	6	40 a
CMRP4478	6	20 a
CMRP4479	6	60 a
CMRP4480	10	80 b
CMRP4481	8	60 a
CMRP4482	6	40 a
CMRP4483	8	60 a
CMRP4484	4	20 a
CMRP4485	4	40 a
CMRP4486	6	60 a
CMRP4487	10	80 b
CMRP4488	10	80 b

Note: Different letters in the column indicate significant differences among isolated fungal strains according to the Tukey test ($p < 0.05$).

A total of 100 insects died in the current experiment. They were individualized in sterile microtubes, and 76 individuals showed fungal extrusion, confirming the isolated fungal strains as the causal agents of death (Figure 2a).



Figure 2. Photographs of *Lema bilineata* showing signs of fungal extrusion: (a) adult with first signs of fungal extrusion; (b) eggs with fungal extrusion.

3.2.2. Pathogenicity Test in *Lema bilineata* Eggs

When performing the former bioassay using *L. bilineata* adults, fungi signals were observed in eggs a few days after those eggs were laid by *L. bilineata* females sprayed with *B. bassiana* conidial suspensions. According to these observations, *B. bassiana* isolates CMRP4480, CMRP4487, and CMRP4488, which were the most virulent in the bioassay with adult individuals (Table 2), were tested for their pathogenicity against *L. bilineata* eggs. We observed that between 58.7% and 66.7% of eggs were unhatched after seven days (Table 3). In this case, CMRP4480 was the most virulent isolate, being significantly different ($p < 0.05$) from the rest of the isolates (Table 3).

Table 3. Mortality rates of *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) eggs after inoculation with conidial suspensions (10^8 conidia mL^{-1}) of three isolated *Beauveria bassiana* strains. Data are means \pm standard deviations.

Isolate	Rate (%)
Control	6.7 \pm 1.8 a
CMRP4480	66.7 \pm 1.6 c
CMRP4487	60.0 \pm 2.0 b
CMRP4488	58.7 \pm 2.4 b

Note: Different letters in the column indicate significant differences among isolated fungal strains according to the Tukey test ($p < 0.05$).

All unhatched eggs that underwent spraying came to be considered dead, since the non-hatching rate in the control groups was only 8.8%. Fungal sporulation was detected in most eggs that did not hatch (Figure 2b).

4. Conclusions

This is the first study about entomopathogenic fungi isolated from *P. peruviana* crops to be tested against *L. bilineata*. All 15 fungal isolates tested had different levels of pathogenicity. The CMRP4480, CMRP4487, and CMRP4488 isolates induced the highest mortality rates in *L. bilineata* adults and unhatched eggs. Our findings in the laboratory showed that *B. bassiana* isolates, as biological control agents with pathogenic potential against *L. bilineata*, are a promising alternative to the traditional chemical insecticides that are currently employed for this task. However, these results must be expanded with experiments in open fields in order to evaluate entomopathogenic fungi action in uncontrolled conditions as a

step forward in the development of better IPM approaches and their use as a biopesticide. The data presented here could help to improve the initial development of IPM strategies for *P. peruviana* crops, since no synthetic insecticides are available for the specific control of *L. bilineata* in Brazil.

Author Contributions: Conceptualization, J.L.F., A.K.d.C.S. and I.C.P.; methodology, J.L.F. and I.C.P.; software, M.F.V.; validation, J.L.F., A.K.d.C.S. and M.F.V.; formal analysis, M.F.V.; investigation, J.L.F., A.K.d.C.S. and M.F.V.; resources, M.A.C.Z. and I.C.P.; data curation, J.L.F. and A.K.d.C.S.; writing—original draft preparation, J.L.F., A.K.d.C.S., M.A.C.Z. and I.C.P.; writing—review and editing, J.L.F., M.A.C.Z. and I.C.P.; supervision, I.C.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: M.F.V. and A.K.C.S. received fellowships from Education Coordination for the Improvement of Higher-level Personnel—CAPES—Finance Code 001 (www.capes.gov.br), Brazil.

Acknowledgments: The authors express their gratitude to Adelia Maria Bischoff for assisting in the capture and beginning of *L. bilineata* rearing and to Karin Hoch Fehlauer Ale. and her team at EscritaLAB for correcting the English language of this manuscript. We are also grateful to PRPPG-UFPR (Edital n°007/2021).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Monti, M.M.; Ruocco, M.; Grobbelaar, E.; Pedata, A. Morphological and molecular characterization of *Lema bilineata* (Germar), a new alien invasive leaf beetle for Europe, with notes on the related species *Lema daturaphila* Kogan & Goeden. *Insects* **2020**, *11*, 295. [[CrossRef](#)]
- Bado, S.G.; Cerri, A.M.; Vilella, F.; Molina, A. Aspectos morfológicos, biológicos y de ingesta de *Lema bilineata* (Germ) (Coleoptera: Chrysomelidae) sobre *Physalis peruviana* L. *Bol. San. Veg. Plagas* **2000**, *26*, 5–10.
- Servizio Fitosanitario Regionale. *Lema bilineata* (Germar)—Chrysomelidae Sudamericano del Tabaco. Assessorato Agricoltura: Regione Campania, Italy. 2017. Available online: <http://agricoltura.regione.campania.it/difesa/lema-bilineata.html> (accessed on 21 May 2020).
- Bischoff, A.M.; Furuie, J.L.; Benatto, A.; Zimmermann, R.C.; Araujo, E.S.; Baena, R.; De Oliveira, M.C.H.; Zawadneak, M.A.C. First report of *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) damaging *Physalis peruviana* (L.) in Brazil. *Ciência Rural* **2021**, *51*, e20200735. [[CrossRef](#)]
- Stevens, M.M.; Stanton, R.A.; Wu, H.; Sampson, B.; Weir, T.A.; Reid, C.A.M.; Mo, J. Detection of *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) in Australia. *Gen. Appl. Entomol.* **2010**, *39*, 1–3.
- Ormeño, J.; Araya, J.E.; Diaz, C.A. Supervivencia y alimentación comparativa de larvas de *Lema bilineata* Germar en *Datura* spp., tabaco y otras solanáceas. *Bol. San. Veg. Plagas* **2002**, *28*, 21–31.
- Bennett, A.; Du Toit, C.L.N.; Bennett, A.L. A new record of *Lema trilinea* White (Coleoptera: Chrysomelidae) on tobacco in South Africa, with reference to the common pest species, *Lema bilineata* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae, Criocerinae): Short Communication. *Afr. Entomol.* **1999**, *7*, 316–319.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit—Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. 2020. Available online: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons (accessed on 21 February 2020).
- Baja, E.; Poitevin, C.G.; Araujo, E.S.; Mirás-Avalos, J.M.; Zawadneak, M.A.C.; Pimentel, I.C. Infection of *Beauveria bassiana* and *Cordyceps javanica* on different immature stages of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). *Crop Prot.* **2020**, *138*, 105347. [[CrossRef](#)]
- Araujo, E.S.; Poltronieri, A.S.; Poitevin, C.G.; Mirás-Avalos, J.M.; Zawadneak, M.A.C.; Pimentel, I.C. Compatibility between entomopathogenic fungi and egg parasitoids (Trichogrammatidae): A laboratory study of their combined use to control *Duponchelia fovealis*. *Insects* **2020**, *11*, 630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Araujo, E.S.; Benatto, A.; Rizzato, F.B.; Poltronieri, A.S.; Poitevin, C.G.; Zawadneak, M.A.C.; Pimentel, I.C. Combining biocontrol agents with different mechanisms of action to control *Duponchelia fovealis*, an invasive pest in South America. *Crop Prot.* **2020**, *134*, 105184. [[CrossRef](#)]
- Amatuzzi, R.F.; Poitevin, C.G.; Poltronieri, A.S.; Zawadneak, M.A.C.; Pimentel, I.C. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to soil-borne entomopathogenic fungi. *Insects* **2018**, *9*, 70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Poitevin, C.G.; Porsani, M.V.; Poltronieri, A.S.; Zawadneak, M.A.C.; Pimentel, I.C. Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). *Appl. Entomol. Zool.* **2018**, *53*, 323–331. [[CrossRef](#)]
- Thomas, S.R.; Elkinton, J.S. Pathogenicity and virulence. *J. Invertebr. Pathol.* **2004**, *85*, 146–151. [[CrossRef](#)]

15. De Hoog, G.S.; Guarro, J.; Gené, J.; Ahmed, S.; Al-Hatmi, A.M.S.; Figueras, M.J.; Vitale, R.G. *Atlas of Clinical Fungi*, 4th ed.; Utrecht, Universitat Rovira i Virgili: Hilversum, The Netherlands, 2020; Available online: <https://clinicalfungi.org/> (accessed on 21 January 2021).
16. Vicente, V.A.; Attili-Agelis, D.; Pie, M.R.; Queiroz-Telles, F.; Cruz, M.; Najafzadeh, M.J.; De Hoog, G.S.; Zhao, J.; Pizzirani-Kleiner, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. *Stud. Mycol.* **2008**, *61*, 137–144. [[CrossRef](#)]
17. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipiński, A.; Kumar, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 2725–2729. [[CrossRef](#)]
18. Katoh, K.; Toh, H. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief Bioinform.* **2008**, *9*, 286–298. [[CrossRef](#)]
19. Rehner, S.A.; Minnis, A.M.; Sung, G.; Luangsa-ard, J.; Devotto, S.; Humber, R.A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* **2011**, *103*, 1055–1073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Alves, S.B.; Pereira, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In *Controle Microbiano de Insetos*, 2nd ed.; Alves, S.B., Ed.; FEALQ: Piracicaba, Brazil, 1998; pp. 845–869.
21. Abbott, W.S.A. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **1925**, *58*, 265–267. [[CrossRef](#)]
22. Pell, J.K.; Hannam, J.J.; Steinkraus, D.C. Conservation biological control using fungal entomopathogens. *BioControl* **2010**, *55*, 187–198. [[CrossRef](#)]
23. Altinok, H.H.; Altinok, M.A.; Koca, A.S. Modes of action of entomopathogenic fungi. *Curr. Trends Nat. Sci.* **2019**, *8*, 117–124.