

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA APLICADA

DISSERTAÇÃO

**Análise da Interação de *Metarhizium* spp. com folhas e
sementes de *Vigna unguiculata***

Ana Flávia Carvalho da Silva

2024

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE *Metarhizium* spp. COM FOLHAS E
SEMENTES DE *Vigna unguiculata***

ANA FLÁVIA CARVALHO DA SILVA

Sob a Orientação da Professora

Patrícia Silva Gôlo

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em Fitossanidade.

Seropédica, RJ
Abril de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586a Silva, Ana Flávia, 1996-
Análise da Interação de *Metarhizium* spp. com folhas e sementes de *Vigna unguiculata* / Ana Flávia Silva. - Rio de Janeiro, 2024.
54 f. : il.

Orientador: Patrícia Silva Golo.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de pós-graduação em fitossanidade e biotecnologia aplicada, 2024.

1. Feijão caupi. 2. Bioinsumos. 3. Manejo integrado de pragas (MIP). 4. Fungos entomopatogênicos. I. Silva Golo, Patrícia, 1987-. orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de pós-graduação em fitossanidade e biotecnologia aplicada III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA APLICADA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

ANA FLÁVIA CARVALHO DA SILVA

Dissertação/Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências (Mestre em Ciências)**, no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, área de Concentração em Fitossanidade.

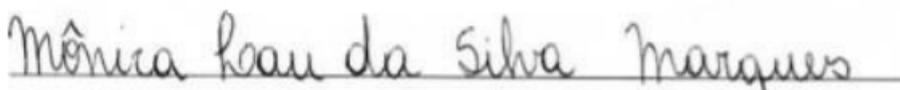
DISSERTAÇÃO (TESE) APROVADA EM 01/03/2024.

Documento assinado digitalmente
gov.br PATRICIA SILVA GOLO
Data: 01/07/2024 13:45:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



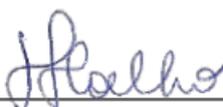
Patrícia Silva Gôlo (Dr.) UFRRJ (Orientadora)

Documento assinado digitalmente
gov.br MONICA LAU DA SILVA MARQUES
Data: 27/06/2024 18:56:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Mônica Lau da Silva Marques (Dra.) IFGoiano

Documento assinado digitalmente
gov.br IRENE DA SILVA COELHO
Data: 28/06/2024 15:32:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Irene da Silva Coelho (Dr.) UFRRJ

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus amigos, aos meus familiares e aos que tive a oportunidade de cruzar durante essa jornada, mas principalmente quem me acompanha desde o início da minha vida “adulta”. Aos meus familiares, dedico tudo e agradeço o apoio, o carinho, o amor e, principalmente, a companhia. Agradeço aos meus irmãos, meus pais, meus tios, meus avós, meus sobrinhos e aos meus animais. Agradeço a Ellie que, se estivesse aqui, estaria tão feliz quanto eu fiquei quando passei a irrigação. Agradeço aos meus pais Neise e Wagner, pelo apoio, sabedoria, amor, parceria e suporte, seja emocional, financeiro e até físico.

Agradeço principalmente aos meus irmãos Karen e Vinícius, e a todos os outros. Meu primo Felipe, que é como um irmão e sempre esteve presente durante a minha jornada. Agradeço ao apoio dos meus amigos e dos relacionamentos que tive. Agradeço principalmente aos meus professores, que tudo me ensinaram, tiveram paciência e transmitiram, além da sabedoria, o amor pelo aprendizado; os professores Mônica, Abboud, Nivaldo e Gorete. Com certeza esse trabalho não sairia sem o apoio, suporte e cessão de meios para que ocorresse; e a minha orientadora Patrícia, por me ensinar, orientar e guiar durante essa jornada. Agradeço a Thaís do laboratório, pois sem ela, com certeza, nada iria para frente. Me orientou, ensinou, auxiliou e permitiu que esse trabalho fosse concluído; Victoria, Adriane, aos alunos de iniciação que auxiliaram nos experimentos e a todos do Laboratório de Controle Microbiano (LCM). Aos meus amigos Marcos Paulo, Henrique e Cardinot. Agradeço a Benassi pela experiência e flexibilidade e, principalmente, a minha amiga Luana, que me auxiliou para que eu conseguisse conciliar os dois.

Mais uma vez agradeço a todos que fizeram parte dessa jornada. Aos meus familiares, tudo o que faço é por vocês; aos meus afilhados, espero que tenham sabedoria para que no futuro conquistem o mundo; e, especialmente meu sobrinho Gabriel: amo você! Você é um guerreiro e um milagre. Aos meus avós Jair, Rui, as minhas avós Marlene e Nair, que sintam minha gratidão do céu; e aos meus pais, que se orgulhem de mais uma etapa. Aos meus sobrinhos e afilhados, que eu possa continuar orgulhando todos vocês. Aos meus professores, gratidão; aos meus amigos de vida e de laboratório, muita prosperidade.

Gostaria de agradecer também ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES): “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”. Por fim, gostaria de agradecer a mim mesma, por não ter desistido e por ter conseguido chegar até onde.

RESUMO

SILVA, Ana Flávia Carvalho da. **Análise da Interação de *Metarhizium* spp. com folhas e sementes de *Vigna unguiculata***. 52p. Dissertação (Mestre em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) tem grande importância para a agricultura familiar no Brasil e, portanto, é alvo de diversas pesquisas que buscam otimizar a produção e a renda destes produtores. O gênero *Metarhizium* spp. tem seu uso clássico relacionado ao controle de pragas agrícolas e, mais recentemente, tem sido estudado como promotor de crescimento vegetal. O objetivo do presente trabalho foi analisar a interação entre feijão caupi e os fungos entomopatogênicos *Metarhizium brunneum* Petch, isolado ARSEF 1095, e *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber, isolado ARSEF 2575, por meio da análise de incremento de massa e altura, desenvolvimento das raízes após tratamento das sementes e microscopia eletrônica de transmissão (MET) de folhas de feijão caupi tratadas com suspensão fúngica. Para a análise do incremento de biomassa e altura, três grupos, com 35 plantas cada, foram formados: ARSEF 1095, ARSEF 2575 e grupo controle (suspensão de Tween a 0,01%). As plantas foram cultivadas em solo estéril em casa de vegetação e tratadas por aspersão foliar com suspensão fúngica na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} . Para determinar a altura final, as plantas foram medidas 30 dias após o tratamento considerando a medida do último nó da parte aérea da planta até o final da raiz. O incremento de altura foi calculado subtraindo-se a altura final da altura inicial. O incremento de biomassa foi obtido pela diferença do peso úmido menos o peso seco da planta. Para a análise do desenvolvimento das raízes, as sementes de feijão caupi foram expostas às suspensões fúngicas nas concentrações de 10^5 e 10^8 conídios mL^{-1} . O grupo controle foi exposto à solução de Tween a 0,01%. Para análise por MET, folhas de feijão caupi com 14 dias de crescimento foram tratadas e analisadas 48h, 72h e 92h após a inoculação fúngica. Após análise dos resultados foi possível observar que não houve incremento de altura e peso para ambos os tratamentos (ARSEF 1095 e ARSEF 2575). O experimento de biomassa revelou ainda que as plantas tratadas apresentaram peso menor do que as plantas não tratadas. Em relação à análise do desenvolvimento das raízes, o tratamento com o isolado ARSEF 2575 na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} resultou em um comprimento de raiz estatisticamente maior (média 16,03 cm) que o grupo controle (média 12,76 cm), indicando o potencial uso deste isolado para inoculação fúngica pela semente. O tratamento das sementes com ARSEF 1095 na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} resultou em raízes menores (média 8,46 cm) que as do grupo controle. Após análise das imagens de MET, não foi possível detectar a presença de material fúngico nos tecidos foliares, apesar do resultado positivo no reisolamento fúngico das folhas usando meio de cultura artificial. O presente estudo ampliou o conhecimento da relação entre isolados de *Metarhizium* spp. e feijão caupi e apresenta resultados que corroboram com a hipótese de que, além da seleção dos isolados de fungos entomopatogênicos, as concentrações destes e o método de inoculação fúngica devem ser estudados para obtenção de resultados benéficos para o desenvolvimento da planta.

Palavras-chave: Feijão caupi. Controle biológico. Manejo integrado de pragas. Bioinsumos.

ABSTRACT

SILVA, Ana Flávia Carvalho da. **Analysis of the interaction between *Metarhizium* spp. with *Vigna unguiculata* leaves and seeds.** 52p. Dissertation (Masters in Fitossanitary and Applied Biotechnology). Institute of Biological and Health Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Cowpea (*Vigna unguiculata*) has great socioeconomic importance for family farming in Brazil. It is, therefore, the target of several studies that seek to optimize the production and income of these producers. The entomopathogenic fungus *Metarhizium* has its classic use related to controlling agricultural pests and has recently been studied as a growth promoter in some crops. The objective of the present work was to analyze the interaction between cowpea and the entomopathogenic fungi *Metarhizium brunneum* Petch, isolated ARSEF 1095, and *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber, isolated ARSEF 2575 through the analysis of increase in mass and height, root development after seed treatment, and transmission electron microscopy (TEM) of cowpea leaves treated with fungal suspension at a concentration of 10^8 conidia mL⁻¹. To analyze the increase in biomass and height, three groups, with 35 plants each, were formed: ARSEF 1095, ARSEF 2575, and the control group (Tween at 0,01%). The plants were grown in sterile soil in a greenhouse and treated by leaf spraying with a fungal suspension at a concentration of 10^8 conidia mL⁻¹. To determine the final height, the plants were measured 35 days after treatment, measuring the last aerial part of the plant to the end of the root. The height increment was calculated by subtracting the final height from the initial height. The increase in biomass was obtained through the difference in the wet weight minus the dry weight of the plant. To analyze root development, cowpea seeds were exposed to fungal suspensions at concentrations of 10^5 and 10^8 conidia mL⁻¹. The control group was exposed to [0.01] % Tween 80 solution. For TEM analysis, cowpea leaves with 14 days of growth were treated and analyzed 48h, 72h, and 92h after fungal inoculation. After analyzing the results, it was possible to observe that there was no increase in height and weight for either treatment (ARSEF 1095 and ARSEF 2575). The biomass experiment also revealed that treated plants had lower weight than untreated plants. Regarding the analysis of root development, treatment with the isolate ARSEF 2575 at concentrations of 10^5 conidia mL⁻¹ resulted in a root length (average of 16.03 cm) that was statistically greater than the control group (average of 12.76 cm), indicating the potential use of this isolate for fungal inoculation by seed. Seed treatment with the isolate ARSEF 1095 (*Metarhizium brunneum* Petch) at concentration of 10^5 conidia mL⁻¹ resulted in smaller roots than those in the control group (average of 8.46 cm). After analyzing the TEM images, it was not possible to detect the presence of fungal material in the leaf tissues despite the positive result in the fungal reisolation of the leaves using an artificial culture medium. The present study expanded knowledge of the relationship between isolates of *Metarhizium* spp. and cowpea and presents results that corroborate the hypothesis that in addition to the selection of entomopathogenic fungal isolates, their concentrations, and fungal inoculation methods must be studied to obtain beneficial results for plant development.

Keywords: Cowpea. Biological control. Integrated Pest Management. Entomopathogenic fungi.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Percentual de placas contendo tecidos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp colonizados por fungos entomopatogênicos 23

Tabela 2: Análise da germinação de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp dez dias após tratamento com suspensão fúngica de *Metarhizium* spp 23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Média e desvio padrão do incremento de biomassa (g) e altura (cm) de *Vigna unguiculata* (L.) Walp tratadas ou não com fungos entomopatogênicos. (A) Incremento de biomassa. (B) Incremento de altura. (CTR): grupo de plantas não tratadas com o fungo. (2575): plantas tratadas com o isolado ARSEF 2575 de *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber. (1095): plantas tratadas com o isolado ARSEF 2575 de *Metarhizium brunneum* Petch. As letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos de acordo com oneway ANOVA seguida do teste de Tukey ($P < 0,05$) 21

Figura 2. Exemplos representativos da colonização fúngica de diferentes espécies de *Metarhizium* spp. em feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). (A) Caules de planta tratada com *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber ARSEF 2575. (B) Caules de planta tratada com *Metarhizium brunneum* ARSEF 1095. (C) Caules de plantas do grupo controle (sem tratamento fúngico). (D) Raízes de planta tratada com *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber ARSEF 2575. (E) Raízes de planta tratada com *Metarhizium brunneum* Petch ARSEF 1095. (F) Raízes de plantas do grupo controle. (G). Folhas de planta tratada com *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber ARSEF 2575. (H) Folhas de plantas tratada com *Metarhizium brunneum* Petch ARSEF 1095. (I) Folhas de plantas do grupo controle 22

Figura 3. Análise do comprimento das raízes nos diferentes grupos testados (controle e tratamentos com fungos entomopatogênicos) em teste de germinação adaptado. (A) Sementes tratadas com ARSEF 1095 na concentração de 10^5 conídios/mL, (B) Sementes tratadas com ARSEF 2575 na concentração de 10^5 , (C) Sementes com suspensão aquosa com Tween 0,01% (Controle), (D) Sementes tratadas com ARSEF 1095 na concentração 10^8 , (E) Sementes tratadas com ARSEF 2575 na concentração 10^8 . (F) Número médio e desvio padrão da germinação de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp tratadas com suspensões de ARSEF 1095 e ARSEF 2575 em diferentes concentrações. Ambos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro - wilk. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos de acordo com one-way ANOVA seguida do teste de Tukey ($P < 0,05$) 24

Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão de folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp sem tratamento fúngico (grupo controle). (A, B e C) Folhas 48 horas após aplicação da solução Tween 80 a 0,01. (D e E) Folhas 72 horas após aplicação da solução de Tween 80. (F) Folha 92 horas após aplicação do Tween 80. C – Cloroplasto, GA- Grão de amido, PC – Parede celular, Mt – Mitocôndria 25

Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão de folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp tratadas com *Metarhizium brunneum* Petch ARSEF 1095 na concentração de 1×10^8 conídios.mL⁻¹. (A, B e C) Folhas 48 horas após a inoculação fúngica. (D) Folha 72 horas após a inoculação fúngica. (E e F) Folhas 92 horas após a inoculação fúngica. C – Cloroplasto, Gr – Granum, Tc – Tilacóide e Mt – Mitocôndria 26

Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão de folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp tratadas com *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber isolado ARSEF 2575 concentrações de 1×10^8 conídios mL⁻¹. (A e B) Folhas 48 horas após a inoculação fúngica. (C e

D). Folhas 72 horas após a inoculação fúngica. **(E e F)** Folhas 92 horas após a inoculação fúngica. **C** – Cloroplasto, **N** – núcleo, **GA** – grão de amido, **Tc** - Tilacóide, **EE** – espaço extracelular e **Mt** – Mitocôndria 27

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1 REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1 Feijão Caupi (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp)	3
1.2 Controle Biológico.....	4
1.3 Fungos Entomopatogênicos.....	5
1.4 Interação entre <i>Metarhizium</i> spp. e as Plantas	7
1.5 Influência de Fatores Abióticos no Desenvolvimento de Fungos Entomopatogênicos	9
1.6 O Fungo Entomopatogênico <i>Metarhizium</i>	10
1.7 <i>Metarhizium</i> spp. como Promotor de Crescimento em Plantas	15
2 MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 Origem dos Isolados.....	17
2.2 Preparo das Suspensões Fúngicas	17
2.3 Inoculação de <i>Metarhizium robertsii</i> e <i>brunneum</i> em <i>Vigna unguiculata</i>	17
2.3.1. Montagem e condução de experimento em casa de vegetação	17
2.3.2. Avaliação da biomassa e altura das plantas	18
2.3.3. Reisolamento fúngico dos tecidos de <i>Vigna unguiculata</i> tratados com fungos	18
entomopatogênicos	18
2.4 Análise do Desenvolvimento de Raízes em Sementes de <i>Vigna unguiculata</i>	19
2.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	19
3 RESULTADOS	21
3.1 Viabilidade dos Isolados Fúngicos.....	21
3.2 Avaliação de Incremento de Biomassa e Altura.....	21
3.3 Reisolamento Fúngico dos Tecidos de <i>Vigna unguiculata</i> Tratados com Fungos	21
Entomopatogênicos	21
3.4 Análise do Desenvolvimento de Raízes em Sementes de <i>Vigna unguiculata</i>	23
3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de Folhas de <i>Vigna unguiculata</i>	24
4 DISCUSSÃO	28
5 CONCLUSÕES	30
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

INTRODUÇÃO

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma ótima opção para a agricultura familiar. A demanda do mercado interno e consumo próprio faz com que essa cultura tenha um papel de destaque nas regiões e para os produtores. Seu cultivo normalmente é em consórcio com culturas perenes como o arroz ou em sequeiro em consórcio com milho e/ou mandioca. Os maiores produtores de feijão concentram-se no Nordeste e Norte do Brasil, sendo o Ceará, Bahia e Piauí os três estados com papel de destaque no Brasil. A maior produção se dá em períodos chuvosos, enquanto no período de seca há menor oferta de feijão caupi e, conseqüentemente, alta nos preços (Freire, 2011; Freitas, 2021), atingindo a margem de 1.130.254 hectares plantados e 525.528 toneladas colhidos no ano de 2022 (Embrapa, 2023b).

O mercado de grãos de feijão caupi tem caráter doméstico, com destaque em relação ao autoconsumo dos produtores e venda dos excedentes, sendo que 85% da produção corresponde ao cultivo de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* (L.)) e 15% correspondem ao feijão caupi (Freire Filho, 2011). Devido à importância socioeconômica do feijão caupi, muitos estudos relacionados a novas variedades melhoradas geneticamente voltadas a uma maior produtividade estão sendo produzidos e estimulados (Freire, 2011).

A safra de feijão referente ao ano de 2023/2024 corresponde a 2,79 milhões de ha em área total, e 3,06 milhões de toneladas, indicando um crescimento de 3,4% e 0,8% em relação ao ano anterior. O feijão representa cerca de 1% da produção de grãos (312.300,9 mil toneladas) (CONAB, 2023).

Por meio do Decreto nº 10.375 de 26 de maio de 2020, foi instituída a política nacional de bioinsumos, com o objetivo de promover e estimular o fortalecimento, o desenvolvimento, a promoção de boas práticas, o fomento e a ampliação do uso de bioinsumos no Brasil, sendo competência do Ministério de Agricultura e Pecuária. Sua finalidade é ampliar e fortalecer a utilização de bioinsumos no país para beneficiar o setor agropecuário para fins do Programa Nacional de Bioinsumos:

[...] bioinsumo é todo produto, processo ou tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana, destinado ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, nos sistemas de produção aquáticos ou de florestas plantadas, que interfiram positivamente no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, de plantas, de microrganismos e de substâncias derivadas e que interajam com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos (Brasil, 2020).

Bioinsumo, de acordo com a etiologia, significa “biológico” “insumos”, ou insumos de origem biológica; logo, qualquer produto, tecnologia e processo, desde que seja de origem biológica ou derivados desses agentes biológicos – que podem ser de origem vegetal, animal ou microbiológica –, são classificados como bioinsumos para serem utilizados nas atividades agrícolas e agropecuárias (Vidal; Saldanha; Verissimo, 2020). Seu uso tem crescido nas chamadas modalidades ou produção “*On Farm*”, que refere-se à produção do bioinsumo na propriedade agrícola.

Os bioinsumos têm crescido bastante no uso agrícola como alternativa para o sistema convencional de produção, na tentativa de mitigação dos danos socioambientais, estímulo ao implemento da política da química verde e políticas públicas que promovem a sustentabilidade. Como exemplo podemos citar o uso de microrganismos com efeito bioestimulante, com

aplicação no controle biológico, ou como biofertilizantes, fitohormônios e afins. O uso do controle biológico tem crescido em culturas de importância como soja, café, feijão e outras. Diversos fungos e bactérias são utilizados como agentes de biocontrole de pragas artrópodes, prática esta impulsionada pela biotecnologia. Um dos exemplos é o uso da bactéria com capacidade inseticida *Bacillus thuringiensis* Berliner e suspensões em que o ingrediente ativo são fungos entomopatogênicos como *Beauveria*, *Cordyceps*, *Metarhizium* e *Trichoderma*. Diversas empresas têm investido nesse ramo devido ao seu potencial de controle efetivo e baixo custo para o produtor; além disso, o uso de agentes biológicos favorece a microbiota do solo, uma vez que estes microrganismos podem atuar como bioestimulantes ao mesmo tempo que efetuam um controle eficiente contra pragas e doenças agrícolas (Vidal; Saldanha; Verissimo, 2020).

O Brasil é um dos países com grande destaque e investimentos nesse setor, estimulando cada vez mais o uso de bioinsumos na agricultura. Um dos fatores que contribui para este cenário é a elevada biodiversidade nacional, o que favorece a descoberta de inúmeros microrganismos benéficos para a produção animal e vegetal. O uso de bioinsumos é considerado sustentável e, na maioria das vezes, apresenta baixo custo quando comparado aos produtos convencionais, além de apresentar baixo potencial contaminante e poluidor ao meio ambiente.

No presente trabalho, o potencial de fungos entomopatogênicos (ex., *Metarhizium* spp.) como promotores de crescimento de plantas foi explorado. Um dos principais objetivos foi definir se isolados do gênero *Metarhizium* contribuem positivamente para o desenvolvimento de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (popularmente conhecido como feijão caupi).

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Feijão Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)

A princípio a espécie domesticada *Vigna unguiculata* (L.) Walp foi classificada no gênero *Phaseolus*, em seguida, *Dolichos*, até chegar a sua nomenclatura atual que é *Vigna*. O feijão caupi tem origem na África (Freire, 2021; Freire; Queiroz, 2023) e foi introduzido em território brasileiro no século XVI no estado da Bahia por meio dos colonizadores portugueses, sendo disseminado para a região Norte no século XVIII, a partir da região Amazônica (Freire Filho, 2023).

As primeiras cultivares de feijão caupi só foram lançadas a partir de 1967, e cultivares como a Seridó, a IPEAN V-69 e a Pitiúba são pioneiras (Freire; Queiroz, 2023). Em 1974 foi criada a Embrapa Arroz e Feijão (centro nacional de pesquisa de arroz e feijão), em seguida o programa nacional de pesquisa de feijão em 1981, e o serviço de produção de sementes básicas em 1975. Todos esses programas e políticas públicas estimularam pesquisas e o desenvolvimento de cultivares melhoradas de *V. unguiculata* (L.) Walp, pois antes de 1967 havia apenas uma cultivar crioula para cada região (Freire Filho, 2023). Até o ano de 2021 existiam 53 cultivares oficialmente disponíveis para a produção. No ano de safra de 2021 e 2023 o feijão caupi foi responsável por aproximadamente 21,86% e 18,26% respectivamente do total da produção de feijão (CONAB, 2013; Freire; Queiroz, 2023). Atualmente com os avanços tecnológicos foi possibilitada a mecanização do cultivo e foi incorporado aos sistemas de grande produção (Freire; Queiroz, 2023).

O feijão caupi é uma cultura que, em sua maioria, é cultivada por agricultores de pequeno a médio porte por meio da agricultura familiar. Sua elasticidade e sua resistência a condições adversas e a fenômenos meteorológicos são fatores fundamentais para a adaptabilidade da cultura ao longo do território brasileiro (CONAB, 2013). Devido aos hábitos de consumo regional, essa cultura é mais produzida nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (CONAB, 2023); porém, atualmente o cultivo vai além, sendo cultivado nas regiões Centro Oeste, Sudeste e Distrito Federal, principalmente na região Centro Sul (CONAB, 2023; Freire; Queiroz, 2023).

A safra de feijão referente ao ano de 2023/2024 corresponde a 2,79 milhões de ha em área total, e 3,06 milhões de toneladas, indicando um crescimento de 3,4% e 0,8% em relação ao ano anterior. A produção total de feijão (todos os gêneros) representa próximo de 1% da produção de grãos (312.300,9 mil toneladas) (CONAB, 2023).

Constata-se que Níger, Nigéria e Brasil são os países que têm a maior área cultivada, (Freire, 2011). O mercado de feijão caupi possui três segmentos: produção de grãos secos, vagens e grãos verdes (feijão-verde) (Embrapa, 2021; Freire *et al.*, 2011; Freire, 2021), outro segmento de mercado mais recente é o feijão industrializado, usado para farinha, enlatados e afins (Embrapa, 2021).

Em 2007, a primeira cultivar utilizada para exportação foi a BRS Guariba, sendo que o Brasil exportou para países norte-americanos como o Canadá, europeus como Portugal e asiáticos como Israel, Turquia e Índia (Freire *et al.*, 2011). Em 2020 o Brasil exportou para os Estados Unidos da América (EUA), Paquistão, Canadá e China, chegando à margem de 46.353 toneladas. Em 2014 85% das exportações do caupi foram destinadas ao Oriente Médio e ao continente asiático e europeu (Freire *et al.*, 2011).

Segundo Silva *et al.* (2016) e Embrapa (2021), EUA, Peru, Brasil e diversos países do continente africano (Níger, Mali e Burkina Faso) são os maiores exportadores; já países

pertencentes ao continente Asiático como Índia, Paquistão, Vietnã e Indonésia são grandes importadores do feijão-caupi brasileiro. Estima-se um ganho médio superior a 77,5 milhões de dólares (Oliveira; Caselli; Pinheiro, 2023).

A temperatura ótima para o cultivo do feijão caupi é entre 17 e 25°C. Temperaturas elevadas (acima de 35°C) afetam a produção, causam abortamento dos botões florais e interfere nos rendimentos dos grãos; já temperaturas abaixo de 12°C provocam abortamento de flores e aumento do ciclo. Por sua vez, a umidade relativa acima de 70% aumenta a probabilidade de ocorrência de doenças. É uma cultura em que a termo periodicidade (variação de temperatura diurna e noturna) é essencial para o seu desenvolvimento e sua exigência pluviométrica é em torno de 300 mm/ano.

1.2 Controle Biológico

A biotecnologia representa um conjunto ou uma série de técnicas em que ocorre a manipulação de organismos como plantas, animais e microrganismos como fungos e bactérias com a finalidade de desenvolver novas tecnologias que podem ser aplicadas em diversos setores, principalmente na agricultura, devendo sempre basear a tomada de decisão seguindo os princípios da sustentabilidade e da segurança alimentar (Torres *et al.*, 2000). Atualmente a biotecnologia está em pleno desenvolvimento em todo o mundo, seja na medicina, na agricultura ou indústria de alimentos e detém técnicas, materiais e ferramentas de última geração, com grandes investimentos na manipulação de organismos geneticamente modificados (Ferreira; Lima; Rosanova, 2020).

O controle biológico é um método utilizado desde o período neolítico, com o surgimento da agricultura; é baseado em princípios naturalísticos, ou seja, trata-se de um organismo alimentando-se do outro, assim como a cadeia alimentar, mas com a intervenção do homem (Parra *et al.*, 2002). Há forte incentivo para o uso do controle biológico devido a questões socioambientais, pois se comparado aos métodos químicos, além dos produtos registrados biológicos serem tão eficientes quanto, são mais seguros quanto ao risco de contaminação e intoxicação. O registro de produtos biológicos no Ministério da Agricultura e Agropecuária (MAPA), na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Renováveis (IBAMA) tem prioridade conforme estabelece o Decreto nº 4.074/2002, que prioriza produtos de baixa toxicidade. Portanto, são registrados em menos tempo que produtos sintéticos. O uso de agentes biológicos para controle de pragas acontece frequentemente no Manejo Integrado de Pragas (MIP) e representa uma ótima alternativa aos métodos de controle de pragas convencionais. Este método foi primeiramente proposto na década de 1940 para otimizar o uso dos recursos para combate de pragas agrícolas, sendo reconhecido e recomendado pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) a partir da década de 1980 (Waquil *et al.*, 2002).

Vale salientar que agentes microbianos de controle não são o mesmo que organismos geneticamente modificados (Vieira, 2004), e são avaliados por órgãos como a ANVISA, o MAPA e o IBAMA para fins de regulamentação sob os mesmos critérios e procedimentos que os produtos fitossanitários químicos com ingredientes ativos sintéticos, os ditos agrotóxicos, que são regulamentados pela Lei 14.785 de dezembro de 2023 (Lei dos Agrotóxicos).

Quando os produtos biológicos são comparados com os produtos sintéticos, os primeiros possuem os benefícios: não agridem o meio ambiente; não causam intoxicação dos aplicadores; muitas vezes são altamente específicos, preservando os inimigos naturais das pragas; e não são poluidores e nem contaminantes de olhos de água e cursos de água, o que os

torna ideais para um alimento seguro por não deixar resíduos nos produtos destinados ao consumo, aumentando o valor agregado (Monnerat *et al.*, 2020). Isto por que o uso de pesticidas, além de eliminar e afetar a microbiota benéfica dos solos, pode deixar resíduos no meio ambiente e nos alimentos (Santos; Varavallo, 2011).

O mercado dos produtos biológicos está em pleno crescimento no mundo. No ano de 2020 o Brasil teve um crescimento em torno de 70%, movimentando um valor de 464,5 milhões de reais segundo o MAPA (EMBRAPA, 2023a). O Brasil é um dos principais desenvolvedores de produtos de controle biológico no mundo. No país, diversas culturas fazem o uso de controle biológico, sendo que alguns produtores o usam como principal forma de controle, na produção e durante longos períodos com alta eficiência, ao contrário de produtos de controle químicos que promovem com maior facilidade o surgimento de biótipos resistentes, portanto, a longo prazo possuem menor eficiência de controle a cada ciclo.

O uso de produtos biológicos também possui o benefício de reduzir em até 70% os custos com insumos (Medeiros; Vilela; França, 2006). De acordo com publicações, ao comparar o uso do controle químico com o biológico, os gastos do uso do controle biológico foram menores em inseticidas, prestação de serviços, entre outros (Lopes, 2021; Lopes; Paixão; Cruz, 2018; Medeiros; Vilela; França, 2006; Wochner, 2020).

Para fins econômicos, os custos do controle biológico são menores quando comparados ao químico e o ponto de equilíbrio da produção do controle biológico que representa a quantidade necessária para cobrir o custo de produção também é menor. O limite de quebra comparando controle biológico e o controle químico possui um percentual em torno de 62% e a Taxa Interna de Retorno (TIR) indica que há viabilidade econômica do uso do controle biológico com *Trichogramma pretiosum* (Medeiros; Vilela; França, 2006).

Há diversos modos de ação de inseticidas e acaricidas biológicos, sendo que os principais são por meio do contato e por ingestão. Os fungos entomopatogênicos que atuam de forma endofítica são eficientes para controlar organismos ou pragas como pulgões, tripés, cochonilhas, percevejos e afins, que na fase adulta possuem o aparato bucal do tipo sugador, além de atuar por contato nas fases de pupa e ovos (Fontes; Valadares Inglis, 2020). Há relatos de um alcance de 40% de controle, tanto para cigarrinhas (*Deois flavopicta*) quanto para cupins (*Cornitermes cumulans*) em pastagens após o uso de fungos entomopatogênicos (Quintela, 1994).

Em produções de arroz irrigado, *Metarhizium* spp. foi responsável pela redução da população de percevejos (*Tibraca limbativentris*) e para o feijão caupi teve efetividade no controle de brocas (*Chalcodermus bicmaculatus*), de lagartas (*Elasmopalpus lignosellus*) e da vaquinha (*Cerotoma arcuata*) (Quintela, 1994).

1.3 Fungos Entomopatogênicos

O subfilo *Pizezizomycotina* e a classe *Sodariomycetes* abrigam diversas espécies que fazem associação hospedeiro patógeno entre fungos e artrópodes, como ácaros e insetos, sendo assim os mais explorados para fins de controle biológico (Fontes; Valadares Inglis, 2020). A maior parte dos fungos entomopatogênicos utilizados na agricultura pertencem ao filo Ascomycetes (Mascarin; Pauli, 2010). Fungos da divisão Ascomycota possuem um ciclo de vida anamórfico (assexuado) e teleomórfico (sexuado). Sendo assim, um mesmo fungo pode ser identificado por nomes científicos diferentes, mas trata-se do mesmo fungo (Amorim; Rezende; Bergamin Filho, 2018). Muitas das doenças em populações de insetos são causadas por fungos

entomopatogênicos. Além disso, o modo de ação inseticida dos fungos é principalmente pelo contato, e de fácil proliferação e produção (Alves; Farias, 2010).

Fungos entomopatogênicos necessitam de alta umidade, temperatura moderada e proteção contra a radiação solar para serem eficientes no controle biológico. *B. bassiana* (Bals. -Criv.) Vuill., por exemplo, precisou de condições ideais durante dois dias para o controle de *Frankliniella occidentalis* (Fontes; Valadares Inglis, 2020). Fora de condições ideais, germinação, dispersão, reprodução e patogenicidade do fungo podem perder a eficácia. A literatura reporta que em condições inapropriadas, radiação, temperatura e umidade podem interferir na viabilidade dos esporos (Wilcken *et al.*, 2005; Oliveira, 2010; Fontes; Valadares Inglis, 2020). Ainda assim, em situações de estresse há estudos que indicam que os conídios e micélios dos fungos são capazes de sintetizar as “*heat shock proteins*”, proteínas responsáveis pela biossíntese de pigmentos que auxiliam o metabolismo do fungo e minimizam os malefícios causados pelas condições de estresse (Fontes; Valadares Inglis, 2020).

As hidrofobinas e as adesinas são proteínas responsáveis pela adesão e penetração, e são encontradas nos conídios (Fontes; Valadares Inglis, 2020; Leger, 2008; Schrank; Vainstein, 2010) de diversas espécies pertencentes à ordem *Hypocreales* como *Beauveria* e *Metarhizium*. Outras espécies de fungos, como as do gênero *Lecanicillium* e *Hirsutella*, produzem substâncias mucilaginosas que auxiliam na adesão dos conídios. Em artrópodes, após germinação, com o desenvolvimento do tubo germinativo, tem-se a formação do apressório que contém enzimas como quitinases, lipases, peptidases, proteases e diversas outras que auxiliam na degradação da cutícula para a penetração e posterior colonização do hospedeiro. Após a colonização dos tecidos do artrópode, há a exaustão de nutrientes e posterior morte do hospedeiro (Wilcken *et al.*, 2005; Schrank; Vainstein, 2010; Fontes; Valadares Inglis, 2020).

Para produzir microrganismos, a seleção de um meio de cultivo ideal é essencial para seu crescimento. Quando trata-se de fungos, o meio de cultivo ideal é o que permite ótimo desenvolvimento e possibilita a maior esporulação para melhor obtenção de conídios; por isso, quando trata-se de meio de cultura é essencial ter um de qualidade e compatível, pois ele pode influenciar na produção do microrganismo. Fontes de carbono como amido, glicose, sacarose e dextrose são necessárias para o desenvolvimento dos fungos, sendo a dextrose muito utilizada nos meios de cultura, as fontes de Nitrogênio são obtidos através da adição de proteínas, derivados de produtos vegetais como extrato de soja e outros, ambos os nutrientes são elementos essenciais para o desenvolvimento dos fungos. A qualidade e o tipo do meio de cultura interferem na virulência, que remete à agressividade, na patogenicidade, que é a capacidade de causar doença, e em sua estabilidade (Lima *et al.*, 2010).

Há indícios de que a proporção C/N influencia no desenvolvimento fúngico, com maior interferência em meios líquidos, indicando uma proporção ideal de 10/1 na relação C/N. Avaliando diferentes fontes de carbono, foi relatado que meios com amido e glicose apresentaram melhor desempenho para *B. bassiana* (Bals. -Criv.) Vuill. e *M. anisopliae* (Metschn.) Sorokīn, sendo o primeiro melhor para o crescimento e o segundo melhor para esporulação (Lima *et al.*, 2010).

Quando trata-se da produção de fungos entomopatogênicos em meio de cultura, o arroz tem papel de destaque nas publicações, mostrando-se superior tanto em relação à economia quanto à quantidade de conídios aéreos produzidos, quando comparado aos meios que possuem amido e batata e outros meios micológicos, principalmente na reprodução do *M. anisopliae* (Metschn.) Sorokīn (Lima *et al.*, 2010). Mas ao fazer avaliações em que há a trituração de bagaço de cana misturado com arroz e o uso de feijão caupi como substrato, para *B. bassiana* (Bals. -Criv.) Vuill. o arroz se sobressaiu para a produção de conídio e para o *Metarhizium* a

mistura de bagaço com arroz teve um ótimo desempenho, superior ao de arroz, assim como o feijão caupi teve um desempenho superior a 9% quando comparado ao arroz para a produção de conídios (Lima *et al.*, 2010).

1.4 Interação entre *Metarhizium* spp. e as Plantas

Os microrganismos existem em abundantes quantidades, sendo em torno de 0,05% dos solos; além disso, sua capacidade de reprodução é extremamente rápida, podendo levar de 30 minutos a 2 horas para gerar novas gerações. Em condições de altas temperaturas, em torno de 25 a 30°C, e disponibilidade de nutrientes, umidade e matéria orgânica, há um crescimento abundante (Primavessi, 1999).

Todas as plantas, exceto as da família *Brassicaceae* e as *Liliáceas*, possuem forte interação com microrganismos como as micorrizas. Nessa associação, os fungos pertencentes ao filo *Glomeromycota*, através de associações de benefício mútuo (simbiose), auxiliam as plantas a captar nutrientes dos solos por meio das extensões de suas hifas e as plantas atuam liberando nutrientes através de excreções de ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares, hormônios e afins dentro da região denominada como rizosfera (Primavessi, 1999; Antonioli; Kaminski, 1991).

Por meio desta interação, a planta fornece carbono para os microrganismos e os microrganismos fornecem outros nutrientes graças a uma maior área de contato e de seus exsudatos. Além disso, quanto mais nutrida a planta, maior a interação, podendo inclusive proteger a planta de microrganismos, o que torna-se menos eficiente caso a planta esteja sob estresse ou debilitada, incluindo também a interferência na germinação das sementes. Os fungos mobilizam nutrientes e aumentam a capacidade de retenção de água do solo e absorção por meio das plantas; também fixam nitrogênio e inibem o desenvolvimento de patógenos (Primavessi, 1999).

Fungos endofíticos ou endotróficos são fungos que colonizam tecidos vegetais, podendo ser patogênicos ou não; são microscópicos, possuem ocorrência em diversas plantas e são semelhantes a bactérias noduladoras (Primavessi, 1999; Bamisile *et al.*, 2018). Fungos endofíticos que não são fitopatogênicos podem trazer benefícios para as plantas, já que ao colonizar os tecidos das plantas podem formar associações mutualísticas de forma que favoreça as plantas hospedeiras e os fungos. Os fungos se beneficiam com, além da “hospedagem”, o recebimento de carbono, pois são classificados como heterotróficos, então se faz necessária a obtenção de carbono de alguma fonte de matéria orgânica (Bamisile *et al.*, 2018).

Microrganismos eficientes, ou os chamados microrganismos benéficos, recebem essa nomenclatura pois beneficiam a produção vegetal, assim como fungos que fazem associações micorrízicas, fungos solubilizadores de nutrientes, reguladores hormonais e que atuam como micoinseticidas (entomopatogênicos) ou antimicrobianos (Alves, 2019). O modo de ação dos fungos endofíticos basicamente é entrar na raiz, e quando o crescimento fica estagnado ele para sua atividade, permanecendo no solo e voltando apenas quando há novamente o desenvolvimento do ciclo. Os fungos endofíticos diferem-se dos ectotróficos pela capacidade do parasitismo, ou seja, se as condições nutricionais ficarem adversas eles podem se tornar maléficis para a planta, pois passam a competir, dependendo assim das condições do hospedeiro e do ambiente em que está localizado (Primavessi, 1999).

Foram relatados ótimos resultados quando observada a interação entre as plantas e os fungos. Ao avaliar o desenvolvimento vegetal é relatado o crescimento de raízes, impactando diretamente no aumento na tolerância a estresses bióticos, como pragas e doenças; também é

possível observar um aumento na tolerância a estresses abióticos, como o déficit hídrico por seca e o estresse salino. Khan *et al.* (2012) relatam que a interação entre as plantas e o fungo

M. anisopliae (Metschn.) Sorokīn induz o aumento na concentração de hormônios como o ácido jasmônico. Além da interferência na produção de ácido jasmônico, também há uma produção de auxina (Liao *et al.*, 2014), mas não se sabe a dimensão dos benefícios desses fungos ao colonizar a rizosfera, pois ao mesmo tempo que beneficiam as plantas, também agem como condicionadores de solos, logo melhoram os atributos físicos, químicos e biológicos, interferindo positivamente na produtividade (Gomes *et al.*, 2016; Carvalho, 2018; Alves, 2019).

Os efeitos dos fungos endofíticos para as plantas podem ser: indiretos, utilizando o micoparasitismo como controle de patógenos e pragas e por meio do estímulo da indução de mecanismos de defesa pela planta; ou diretos sobre o desenvolvimento vegetal, graças à regulação hormonal e aos mecanismos de solubilização e mineralização de minerais como o fósforo, que favorecem o crescimento das plantas hospedeiras (Alves, 2019).

Os mecanismos diretos são referentes às mudanças internas, como mudanças no metabolismo e regulações hormonais, por meio de reguladores de crescimento e acionamento do sistema de defesa das plantas, como o sistema Resistência sistêmica adquirida (SAR) e Resistência sistêmica induzida (SIR). Ao perceber os elicitores (padrões moleculares associados a micróbios MAMPs) e reconhecer o MAMP, o sistema de defesa das plantas induzem uma resposta que impacta positivamente na imunidade da planta, mas afeta tanto os organismos patogênicos quanto os não patogênicos. Esse reconhecimento ocorre mediante o sistema de reconhecimento gene a gene por esses receptores, sendo que assim que esses elicitores conseguem ser reconhecidos no tecido da planta esse mecanismo é ativado; ou seja, ao ser reconhecido pelos receptores, é induzida uma resposta (Resende *et al.*, 2013).

Já os mecanismos indiretos ocorrem de forma externa à planta, de forma que inibem a reprodução de fitopatógenos que interferem negativamente no desenvolvimento das hospedeiras; dessa forma, esses fungos atuam como agentes de controle biológico (Alves, 2019; Melo Júnior, 2020). Esses solos que abrigam uma microbiota diversificada são chamados de solos supressivos, que correspondem a solos em que a doença não se manifesta com alta incidência, pois a severidade e a agressividade das doenças são baixas, não chegando ao nível de dano econômico ou de controle (Lobo Junior; Macedo; Goulart, 2022).

Os fungos endofíticos, ao colonizarem a planta, podem interagir de forma direta sobre o crescimento vegetal, fazendo uso dos mecanismos de solubilização e mineralização de fósforo e nitrogênio, deixando o fósforo solúvel para a pronta absorção pela planta, o que aumenta a disponibilização para as plantas. Também podem agir de forma indireta, que seria o controle de pragas e doenças mediante micoparasitismo (Melo Júnior, 2020) e promoção da indução do aumento da resistência das plantas, aumentando assim seus mecanismos de defesa contra a herbivoria, aumento da produção de metabólitos secundários, aumento de área foliar, aumento de quantidade de clorofila e aumento nas taxas fotossintéticas, maior tolerância aos estresses bióticos e abióticos (Alves, 2019; Behie; Jones; Bidochka, 2015; Santos; Varavallo, 2011).

A inoculação de microrganismos promotores do crescimento induz alterações na arquitetura da planta, no desenvolvimento radicular e aéreo, resultando em incremento na biomassa. Em um experimento, algumas mudas inoculadas com *T. asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg apresentaram maior número de pontas de raízes e de ramificações laterais, maior proporção de raízes grossas, maior acúmulo de biomassa, maior altura da muda, maior diâmetro do coleto e incremento no número de folhas e na massa seca de raízes. Houve também maior precocidade nas mudas inoculadas com *T. Asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg em até três

meses. Isto indica que a inoculação com microrganismos, especialmente *T. Asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg, alterou características morfológicas da planta, e promoveu incremento na biomassa da planta, número de folhas e precocidade; em geral, houve benefícios e aumentos em todos os aspectos produtivos (Melo Júnior, 2020).

Há diversos relatos de microrganismos endofíticos como o *Metarhizium* atuar mais precisamente na região da rizosfera (Canassa *et al.*, 2019). Nessa região há uma zona de concentração de compostos orgânicos exsudados pela raiz, que induzem a relação mutualística entre planta e fungo (Patreze, 2003; Kiriachek *et al.*, 2009). Além disso, promovem o crescimento de raízes, alterações na arquitetura do sistema radicular e maior absorção de nutrientes por parte das plantas hospedeiras, aumentam a resistência a fatores abióticos e bióticos e quando há duplas associações como fungos micorrízicos (associação de fungos de solo e raízes de plantas) associados à microrganismos fixadores biológicos de nitrogênio, potencializam a fixação biológica, sendo assim, promovem melhores condições no solo e maior absorção de nutrientes, que são essenciais para que esse processo ocorra, uma vez que se encontram em altas concentrações em plantas micorrizadas, como P, Zn e Cu^{3+} que influenciam na nodulação e fixação biológica (Patreze, 2003).

Durante essa associação, as hifas fúngicas atuam como uma extensão radicular, aumentando a absorção de água e de nutrientes, principalmente aumentando a absorção do fósforo (Silva *et al.*, 2017). Há relatos de evidências de em que alguns fungos, incluindo do gênero *Metarhizium*, atuam na transferência direta de derivados ou fontes de nitrogênio dos insetos hospedeiros para as plantas. Esse estudo foi feito com culturas de importância econômica como soja e feijão, além de outras, e foi evidenciado a transferência, tanto *in vitro* quanto em campo, indicando que tanto o fungo *Metarhizium* quanto o fungo *Beauveria* são capazes de transferir grandes quantidades de nitrogênio aumentando a produtividade da cultura (Behie; Bidochka, 2014).

Os sideróforos atuam na promoção de crescimento através da disposição de ferro para as plantas. O ferro é um elemento essencial para as plantas sendo muito importante para o metabolismo das plantas, principalmente para o funcionamento de diversas enzimas (Maria *et al.*, 2002; Siqueira *et al.*, 2020); dessa forma, os sideróforos têm a função de solubilizar e quelatar o ferro e incorporar no metabolismo microbiano. Então, os microrganismos transformam o Fe^{3+} inorgânico em Fe^{2+} , que fica disponível para assimilação das plantas (Maria *et al.*, 2002; Siqueira *et al.*, 2020). Além disso, segundo estudos, cada isolado tem uma melhor capacidade de solubilização de fosfato devido a própria capacidade de produção e sideróforos ser diferentes (Siqueira *et al.*, 2020). Diversos microrganismos são conhecidos por produzir sideróforos, em especial fungos, algumas plantas, bactérias etc. (Maria *et al.*, 2002).

1.5 Influência de Fatores Abióticos no Desenvolvimento de Fungos Entomopatogênicos

Em relação à temperatura, de forma geral os microrganismos entomopatogênicos têm uma faixa de crescimento ótima entre 20 e 30°C (Alexandre *et al.*, 2006). Há relatos de que os isolados obtiveram um ótimo crescimento em temperaturas entre 24 e 28°C, de forma que o melhor crescimento foi obtido na temperatura de 28°C, e para a esporulação algumas colônias obtiveram melhor eficiência na temperatura de 24°C (Arruda, 2005). Outros estudos indicam uma faixa entre 21°C e 27° de melhor crescimento (Lanza; Euclides, 2009), levando em conta que cada espécie de um gênero é um indivíduo diferente. Também há um impacto em diferentes isolados, mas sempre dentro da faixa normal de temperatura para essa categoria de fungos entomopatogênicos.

Já em baixas temperaturas (10°C) foi possível observar paralisação do crescimento em algumas espécies, mas algumas continuaram a apresentar crescimento (Arruda, 2005; Lanza; Euclides, 2009); e em temperaturas iguais ou maiores que 37°C não houve crescimento dos isolados (Arruda, 2005; Lanza; Euclides, 2009; Lima *et al.*, 2010). Em temperaturas extremas, como 2 e 40°C, não houve crescimento de nenhum isolado, no entanto, ao submeter a ciclos de temperaturas, de 10°C e logo após ser submetidas a 28°C, foi possível observar a retomada de crescimento. Mas ao fazer o mesmo ensaio expondo os isolados a 37°C e depois expondo a 28°C não houve retomada de crescimento, indicando uma perda de viabilidade; a radiação solar e umidade também influenciam na viabilidade e persistência dos conídios em campo (Arruda, 2005; Lanza; Euclides, 2009; Lima *et al.*, 2010; Fontes; Valadares Inglis, 2020).

A forma de aplicação mais usada no Brasil é inundativa, com a ação lenta dos fungos nas pragas devido ao seu modo de ação. Em culturas anuais, ou que são tratadas como anuais, que ficam pouco tempo no campo devido ao seu ciclo biológico ou de colheita, demandam elevadas dosagens para que ocorra um controle eficiente de pragas, em doses entre ordens de 10^{12} e 10^{13} conídios/hectare (Mascarin; Pauli, 2010). O fato de os conídios persistirem pouco tempo no ambiente devido às condições adversas do tempo (Bamisile *et al.*, 2023; Mascarin; Pauli, 2010) e o efeito de incompatibilidade dos agroquímicos é uma restrição que deve ser levada em conta quando trata-se de biológicos.

Sendo assim, fatores bióticos e abióticos como umidade, temperatura e radiação solar interferem na virulência, patogenicidade, estabilidade e eficiência do produto em campo; a temperatura e a radiação têm grande impacto na inativação e persistência dos conídios e são responsáveis por alterações e danos no DNA dos fungos (Arruda, 2005). Em relação ao fotoperíodo, a *B. bassiana* (Bals. -Criv.) Vuill. teve maior produção de esporos quando submetida a luzes intermitentes e o *M. anisopliae* (Metschn.) Sorokin teve melhor desempenho em um fotoperíodo de 16 horas com espectros de luz ideais semelhantes aos das plantas (azul, amarelo e vermelho) (Ottatti-de-Lima *et al.*, 2010).

Além da radiação e umidade, a temperatura afeta a estabilidade e a patogenicidade dos patógenos; também foi constatado que o tempo de armazenamento também interfere na velocidade de germinação dos conídios dos fungos *M. anisopliae* (Metschn) Sorokin e *B. bassiana* (Bals. -Criv.) Vuill (Ottatti-de-Lima *et al.*, 2010).

1.6 O Fungo Entomopatogênico *Metarhizium*

Metarhizium é um gênero pertencente ao reino fungi, divisão Ascomycota, subfilo *Pizeizomycotina*, classe *Sordariomycetes*, ordem *Hypocreales*, família *Clavicipitaea*. Nesse gênero podemos encontrar diversas espécies e diferentes agrupamentos. Um dos principais clados é o PARB, formado pelas espécies *Metarhizium anisopliae*, *M. pinghaense*, *M. robertsii* e *M. brunneum*, seguido pelo MGT (*M. majus*, *M. guizhouense* ou *M. taii*) *M. acridum*, *M. globosum* e *M. lepidotae*, *M. alvesii*, *M. humberi*, *M. rileyi*, *M. album*. Para cada espécie pode haver outras variedades, como o caso do *M. anisopliae* com as variedades *Maju* e *anisopliae*; já para *M. flavoviride* encontramos a variedade *minus* e *flavoviride* e a variedade *frigidum*. (Arruda, 2005; Bischoff; Rehner; Humber, 2009; Fontes; Valadares Inglis, 2020; Zimmermann, 2007).

A descrição da espécie *Metarhizium* foi feita inicialmente pelo pesquisador Russo Metschnikoff no ano de 1879, que a classificou como *Entomophora anisopliae* devido ao seu hospedeiro. Seu nome foi modificado para *Metarhizium anisopliae* (Metsch) sorokin em 1983, sendo o último nome atribuído ao cientista que o descreveu. Mas antes algumas espécies como

M. album, *M. brunneum* e *M. chrysorrhoeae* foram descritos por Tulloch (1976) e Rombach, Humber e Evans (1987) (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018).

Taxonomicamente os Fungos pertencentes ao gênero *Metarhizium* são fungos filamentosos (pertencentes às classes informais denominadas hifomicetos), que produzem conidióforos e conídios, e seus esporos em geral são de coloração verde (Kleper *et al.*, 2014). Além disso, geralmente reproduzem-se de forma assexuada por meio de estruturas reprodutivas chamadas conídios; já em sua forma sexuada há a produção de ascos. Possui micélio hialino e septado, com conidióforos característicos como descrito por Metschnikoff (1879). Em sua forma anamorfa podemos observar fiálides ovais-cilíndricas (Bischoff; Rehner; Humber, 2006).

As medições de conídios durante um tempo foram base para diferenciação de espécies, sendo que Tulloch (1976) agrupou o gênero em duas espécies baseado no tamanho dos conídios: *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviride*. As duas espécies apenas se diferenciavam devido ao tamanho do conídio: para *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* o conídio possuía menor tamanho e *M. var. majus* possuía o conídio de maior tamanho (Bischoff; Rehner; Humber, 2006; Zimmermam, 2007).

Segundo Tulloch (1976), o meio de cultura também pode influenciar no tamanho dos conídios, como no caso de *M. Anisoploae* (Metsch) sorokin. As diferenças morfológicas entre as espécies também são baseadas no formato dos conídios e das fiálides; além do aspecto morfológico, a formação do conídio (conidiogênese) em colunas prismáticas e a presença ou ausência de zonas subhimenias eram características morfológicas utilizadas para diferenciar espécies (Driver; Milner; Trueman, 2000).

Mas após os anos 2000, com a descoberta da análise biomolecular, houve diversas mudanças nos cladogramas referentes à taxonomia de fungos. Antes a identificação era apenas de forma morfológica; atualmente, com a biologia molecular e o conhecimento de genética, especialmente, o genoma e o fenótipo, é possível estudar a diversidade genética entre as espécies de *Metarhizium* estudando os genes que estão localizados nas zonas ITS (regiões inscritas internamente), que são regiões que ficam próximas a regiões conservadas, e o uso da técnica RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), que é uma variação do PCR (reação em cadeia da polimerase). Essa técnica consiste em utilizar marcadores moleculares como primers para replicar diversas sequências de DNA do genoma (Binneck *et al.*, 2002; Bischoff; Rehner; Humber, 2006,2009; Driver; Milner; Trueman, 2000; Kleper *et al.* 2014).

Após o uso dessas técnicas, foram descobertas e classificadas mais quatro variedades da espécie *M. anisopliae* e cinco variedades no *Metarhizium flavoviride* e *Metarhizium album*. Essas reclassificações e descobertas tiveram respaldo para que essas variedades virassem espécies utilizando genes de proteínas codificadoras ou marcadores de genes TEF, RPB1, RPB2 e TUB, que estão localizadas no rDNA, e auxiliam a caracterização filogenética (Bischoff; Rehner; Humber, 2006, 2009; Gutierrez *et al.* 2019; Kleper *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2018; Brunner-Mendoza *et al.*, 2018). Sendo assim, ficaram nove espécies – *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *M. guizhouense*, *M. brunneum*, *M. majus*, *M. acridum*, *M. pingshaense*, *M. lepidiotae* e *M. globosum* – dentro do gênero *Metarhizium*, e os grupos *Metacordyceps* e *Metapochonia* foram para suas respectivas famílias e gêneros (Bischoff; Rehner; Humber, 2009; Kleper *et al.*, 2014; Jones, 2017).

Metarhizium é mesófilo e cresce em temperaturas entre 10 e 40°C, de forma que a temperatura ótima de germinação e crescimento é entre 25 e 30°C. Também são relatadas temperaturas entre 21 e 26°C e umidade relativa em torno de 65% como ótimas para a sobrevivência do fungo (Lanza; Monteiro; Malheiros, 2009). A umidade e a temperatura são os fatores abióticos que mais influenciam na sobrevivência e infectividade do fungo (Lanza;

Monteiro; Malheiros, 2009). O desenvolvimento na luz produz mais conídios que no escuro (Oliveira, 2018). *Metarhizium* é um fungo patogênico de insetos e ácaros muito utilizado para controle biológico em grandes culturas (Zimmermann, 2003; Jones, 2017). Além de uma gama de insetos como hospedeiros, ele é encontrado nos solos (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018; Pava-Ripoll *et al.*, 2011), principalmente em áreas florestais e nos agrossistemas em geral, pois além de ser um fungo decompositor também associa-se a plantas (fase saprofítica e fase biotrófica), mas não de forma patogênica, e sim mutualística (Jones, 2017).

A literatura reporta que estes fungos estão mais relacionados evolutivamente aos patógenos endofíticos de plantas do que patógenos de insetos, indicando que *Metarhizium* era possivelmente um simbiote com as plantas e posteriormente evoluiu, adquirindo a capacidade de infectar e matar os insetos; essa hipótese tem respaldo de análises genômicas para enzimas degradadoras de plantas (Barelli *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2011). *Metarhizium* se reproduz de forma vegetativa por intermédio de hifas e conídios que são os propágulos infectantes para artrópodes e para cultivo em meios de cultura. Apesar da diversa gama de hospedeiros, determinadas cepas podem parasitar apenas alguns hospedeiros específicos (Jones, 2018; Schrank; Vainstein, 2010).

O cultivo de *Metarhizium* spp. *in vitro* é relativamente simples e deve ser feito em um meio rico em amido (Jones, 2017). Se a finalidade é a produção de conídios aéreos, deve ser feito em meio de cultivo sólido, de preferência o arroz como substrato, e armazenado a 28°C (Lopes, 2016; Alves; Farias, 2010; Mascarin; Pauli, 2010). Este fungo é facilmente cultivado em arroz, BDA (batata, dextrose e ágar), SDA (ágar, sabouraud e dextrose), trigo, cevada cozidos ou autoclavados (Alves; Farias, 2010; Driver; Milner; Trueman, 2000). *Metarhizium* apresentou decréscimo em sua virulência após oito repicagens em arroz; por isso é recomendado que se cultive o fungo em hospedeiros, pois sua virulência pode ir reduzindo a cada repicagem (Alves, 1998; Frigo; Azevedo, 1986).

Segundo Brunner-Mendoza (2018) e Oliveira e Rangel (2018), a virulência do *Metarhizium* spp. pode ser aumentada alterando as condições de crescimento ou de cultivo.

Meios ou substratos com poucos nutrientes ou “pobres” estimulam a esporulação e uma maior produção de conídios (Pereira; Eira, 1999; Cochrane, 1958; Frigo; Azevedo, 1986). O uso do cultivo em hospedeiros, como insetos, tem vantagem em relação ao substrato de arroz quando trata-se de produção de conídios (Pereira; Eira, 1999; Nahas; Arai, 1987). A preservação do fungo pode ocorrer de acordo com os recursos disponíveis, com finalidade de manter a colônia guardada por longos períodos sem que perca a virulência. As culturas podem ser armazenadas de diversas formas, sendo que, em geral, isto ocorre sob baixas temperaturas, entre 4 e -20°C. Alguns exemplos são: armazenamento em meio de cultura com água destilada e posteriormente incubação a 4°C; óleo mineral nujol e cristais de sílica gel e posterior incubação entre 4 e -20°C; liofilização e nitrogênio líquido (Alves; Farias, 2010).

A literatura reporta que além da capacidade entomopatogênica, *Metarhizium* spp. tem capacidade de colonizar a rizosfera de plantas e atua como promotor de crescimento, aumentando o incremento da biomassa em plantas; além disso, ao melhorar as propriedades físicas e biológicas dos solos, atua como condicionadores de solos (Alves, 2019). Mesmo havendo poucos relatos sobre a atividade endofítica do fungo *Metarhizium*, principalmente em comparação com o gênero *Beauveria*, há vários relatos de aplicações em que houve ótimos resultados, principalmente nas culturas de feijão, tomate fava, colza, mandioca (Barbosa, 2021), pimenta (Jaber; Araj, 2018), entre outras culturas.

Esse gênero tem sido amplamente estudado devido ao seu potencial promotor de crescimento do hospedeiro vegetal. Aplicações de *M. anisopliae* (Metschn.) Sorokīn em feijão

aumentaram a colonização de raízes por parte de fungos que promovem as associações micorrízicas e a quantidade de massa seca da raiz, além de promoverem um maior teor de Fe e B acumulado na parte aérea do feijoeiro (Barbosa, 2021; Alves, 2021).

Outra evidência com a inoculação em sementes de milho com a espécie *M. anisopliae* (Metschn.) Sorokīn através da microbiolização (técnica agronômica que se baseia no revestimento de sementes com conídios viáveis) de milhos foi observado redução do ataque de pragas, como o de lagartas em plântulas e o da larva arame. Além disso, foi observado um maior índice de desenvolvimento dos pelos radiculares em plantas jovens (plântulas), incrementando, assim, o teor de biomassa (Barbosa, 2021). Há relatos de outros benefícios citados além do estímulo do desenvolvimento das plantas, incremento da produtividade e maior incremento na produção de biomassa e proteção contra fitofagia, como produção, regulação e estímulo da produção de hormônios (Farias, 2018).

Quando avaliamos o efeito desses microrganismos na fertilidade do solo é possível notar melhoras na atuação sinérgica dos microrganismos, promovendo uma alteração significativa na fertilidade do solo, indicando que pelo consórcio com outros microrganismos é possível observar uma diferença significativa e incremento em alguns parâmetros, ao mesmo tempo em que ocorre a redução em outros parâmetros essenciais para o desenvolvimento da planta (Alves, 2021). Mas o uso desses agentes microbiológicos no solo, quando analisados de forma unitária, indica um aumento nos teores de carbono, cálcio, fósforo, magnésio, potássio, entre outros parâmetros essenciais de fertilidade de solo, principalmente micronutrientes como Cu, B e Mn. (Alves, 2021). Na associação *M. anisopliae* (Metschn.) Sorokīn com *B. bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., ou na espécie *Purpureocillium lilacinum* em consórcio com *Trichoderma asperellum*, os impactos na fertilidade são significativos para as variáveis biológicas do solo; o consórcio indicou maior resposta no consórcio entre *B. bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. e *M. anisopliae* (Metschn.) Sorokīn.

A interação entre microrganismos inoculados no meio exerce mecanismos de simbioses entre eles (Jones *et al.*, 2018; Alves, 2019); também são relatados efeitos benéficos da simbiose entre *M. brunneum* Petch e *B. bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. no controle de pulgão verde *Myzus persicae* (Jaber; Araj, 2018). Mas um estudo dos efeitos da inoculação entre *M. anisopliae* (Metschn.) Sorokīn e *B. bassiana* em consórcio indica que seu uso aumentou o carbono orgânico e promoveu o acúmulo de nitrogênio nos tecidos das plantas; além disso, foi responsável por reduzir o teor de B nos tecidos das plantas e o teor de massa seca nas raízes ao comparar com seus efeitos de forma unitária (sem interação entre os dois fungos) (Alves, 2021).

A patogênese inicia-se após a sobrevivência do fungo, para ocorrer a penetração nos tecidos. O processo é semelhante para as plantas e insetos: há a formação do tubo de germinação, formação de apressórios e produção de enzimas (proteases, quitinases e lipases), tudo de forma simultânea (Arruda *et al.*, 2005; Barelli *et al.*, 2016; Boldo *et al.*, 2009; Jones, 2017; Webster, 2015), sendo que o processo de penetração nos tecidos é uma combinação de processos químicos principalmente enzimáticos para auxiliar na invasão das células, facilitando a pressão mecânica (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018; Jones, 2017; Lopes, 2016).

Ao ocorrer deposição dos conídios no substrato, há atuação de adesinas codificadas como *Mad1* e *Mad2* (*Metarhizium* adesin 1 e 2) e hidrofobinas codificadas como *ssgA*, que auxiliam ao conídio a prender-se no substrato (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018; Leger; Staples; Roberts, 1992; Wang; Leger, 2007; Gao *et al.*, 2011; Wyrebek; Bidochka, 2013). Em seguida, o conídio germina e começa o processo de infecção; neste processo, para haver a colonização, há a penetração, sendo que, em condições climáticas ideais, o conídio germina (Lopes, 2016; Jones 2018), o fungo forma um tubo de germinação e ocorre a formação de apressórios, de

forma que moléculas Monofostado cíclico de adenosina (AMP cíclico) e íons de cálcio Ca^{2+} são responsáveis por essa sinalização (Clarkson *et al.*, 2012; Brunner-Mendoza, 2018).

Apressórios são estruturas especializadas que penetram na célula e emitem os haustórios, que são as estruturas que retiram os nutrientes do hospedeiro (Jones, 2018). Após a penetração há a colonização, um processo em que as hifas e outras estruturas reprodutivas como conídios e afins começam a ser reproduzidos dentro do inseto (Lopes, 2016).

O processo de penetração do fungo no hospedeiro conta com o auxílio de enzimas que são essenciais para o processo de patogênese, como a protease subtilisina (Pr1), *metalloproteínase termolisina*, *protease tripsina* (Pr2), peptidases extracelulares, entre diversas outras proteínas (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018; Leger; Joshi; Roberts, 1998), e proteases cisteínas (Pr4) (Schrank; Vainstein, 2010). Essas enzimas, além de degradar as proteínas cuticulares, também são de grande importância na obtenção de nutrientes e para evitar a percepção dos mecanismos de defesa do hospedeiro, pois essas peptidases extracelulares também degradam proteínas antifúngicas e têm papel na regulação do pH (Leger; Nelson; Screen, 1999).

Segundo Boldo *et al.* (2009), a endoquitinase CH12 é uma enzima essencial para o processo de patogênese e a enzima Pr1 é mais ativa no processo de penetração. As adesinas 1 e 2 são essenciais para a adesão do fungo ao tecido do inseto e de plantas respectivamente, e são expressas de maneiras diferentes de acordo com o seu hospedeiro (Wyrebek; Bidochka, 2013). Após conseguir entrar na cutícula dos insetos, principalmente na hemocele, moléculas receptoras de reconhecimento de patógenos de insetos (PRRs) interagem com Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ativando os mecanismos de defesas do inseto hospedeiro (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018). Após a colonização, o fungo modifica suas hifas vegetativas em reprodutivas para formar corpos hifais e se reproduzir. Ao mesmo tempo, *Metarhizium* secreta na hemolinfa toxinas oriundas do seu metabolismo secundário, auxiliando no processo da patogênese (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018). Depois, as hifas penetram nas células e causam uma infecção generalizada (Schrank; Vainstein, 2010; Zhang; Xia, 2009); após consumir os nutrientes do hospedeiro, o fungo emite conídios para o exterior do hospedeiro, iniciando um novo ciclo (Schrank; Vainstein, 2010).

A variabilidade genética existente entre os diversos isolados de *Metarhizium* spp. faz com que eles demonstrem diferenças entre si com relação a sua virulência e a capacidade de produzir conídios (Jones, 2017). Devido às particularidades de diferentes hospedeiros até mesmo como diferentes adesinas são expressas, há hipóteses em relação a como há essa variação do processo evolutivo entre espécies. A primeira é em relação ao hospedeiro em que o fungo se associa ou infecta e a outra é que fatores bióticos e abióticos também são responsáveis pela diferença nos processos evolutivos entre espécies (Wyrebek; Bidochka, 2013). Isolados de *Metarhizium* que produzem maior quantidade de destruxinas são mais virulentos (Schrank; Vainstein, 2010; Sree; Padmaja; Murthy, 2008). A adaptação do processo de patogênese do *Metarhizium* spp. em insetos está envolvida com a capacidade de degradar a cutícula e outros componentes do corpo do hospedeiro por enzimas como proteases e lipases.

A hipótese é que essa adaptação é uma forma de o fungo conseguir maior absorção de nitrogênio, inclusive afirma-se que o *Metarhizium* e o *Beauveria* são capazes de translocar o nitrogênio do inseto infectado para o hospedeiro (Barelli *et al.*, 2016; Behie; Bidochka, 2014). Os fungos também possuem estratégias para se camuflar das respostas dos mecanismos de defesa dos hospedeiros: por exemplo, nos artrópodes há a produção de substâncias imunomoduladoras que suprimem as respostas de defesa, sendo que a produção de proteínas semelhantes à dos insetos de colágeno (MCL1) está relacionada a um mecanismo de evasão

dessas respostas ao sistema imunológico do inseto (Schrank; Vainstein, 2010; Wang; Leger, 2007).

O genero *Metarhizium* possui baixa toxicidade para os humanos e relata-se sobre insetos infectados por fungos entomopatogênicos não serem consumidos por seus predadores; um exemplo é o coleóptero *Cheilomenes luneta*, que deixa de consumir alguns afídeos naturalmente predados por este coccinídeo (Zimmermann, 2007; Fontes; Valadares Inglis, 2020).

1.7 *Metarhizium* spp. como Promotor de Crescimento em Plantas

Alguns fungos após a inoculação promovem o crescimento, pelo estímulo da produção de substâncias bioativas como hormônios (Siqueira *et al.*, 2020), que não são nutritivos, mas são fitorreguladores, ou seja, provocam respostas fisiológicas nas plantas, seja inibindo, retardando ou promovendo alguma resposta fisiológica nas plantas (Taiz *et al.*, 2013). Alguns estudos indicam que o *Metarhizium* está associado com a produção de auxina e regulação do ácido jasmônico; o primeiro é responsável pelo crescimento das plantas, já o segundo é incumbido do estímulo de respostas de defesa contra estresse da planta (Deuner *et al.*, 2015), além do estímulo da produção de auxina, também estimula a produção de fosfato e sideróforos ou quitinases. Essas substâncias são associadas como responsáveis pelo crescimento de alguns fungos promotores de crescimento (Siqueira *et al.*, 2020).

Alguns microrganismos possuem a capacidade de produzir auxinas (ácido indol acético), sendo que esta produção tem a capacidade de estimular a associação endógena mutualística entre fungo e plantas. Esses fungos promotores têm a capacidade de aumentar produção de auxinas pelas plantas e alguns atuam produzindo auxina (Siqueira *et al.*, 2020). Um estudo no qual foi avaliada a capacidade de redução do teor de cádmio nos tecidos vegetais de arroz indicou que a inoculação de *M. robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber reduziu o acúmulo de cádmio nos tecidos das plantas de arroz até níveis seguros e recomendados pela FAO (Hussein; Hassan; Joo, 2011).

O *M. robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber também aumentou a produção de biomassa e a altura da parte aérea e resistência ao Cd em plantas de arroz submetidas a estresse devido a altas doses de cádmio. Mesmo em altas doses as plantas de arroz, desenvolveram-se plenamente, mostrando uma boa alternativa para problemas de contaminação por cádmio e chumbo pela biossorção (Chuquiruna; Krugg, 2014; Hussein; Hassan; Joo, 2011; Xiaohan, 2022) e cromo, mas na cultura do sorgo, o efeito da *B. bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. e do *Metarhizium* mostrou-se danoso ao desenvolvimento da planta (Chuquiruna; Krugg, 2014). Também observaram que o *M. robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber estimula a produção de IAA, giberelina, brassinoesteróides e enzimas antioxidantes, fito hormônios como IAA e giberelina são os maiores responsáveis pelo alongamento de raízes e brotos; já os brassinosteróides são grandes agentes de regulação da homeostase REDOX (Xiaohan, 2022).

O fósforo é um elemento que é altamente retido pelo solo, sendo assim pouco disponível para uso, pois ficam adsorvidos em colóides do solo que retêm esses cátions. Além disso, há perdas devido à lixiviação, ou seja, há baixa disponibilidade para as plantas devido à absorção dos colóides e baixa eficiência, que fica em torno de 10 a 25% dos adubos fosfatados (Mendes; Reis Junior, 2003; Siqueira *et al.*, 2020).

Estima-se que entre 1 e 10% do fósforo encontrado no solo é encontrado na biomassa microbiana, mesmo não ficando disponível prontamente para as plantas, e contribui para a fertilidade do solo. Os microrganismos atuam de diversas formas: uma delas é solubilizando o fósforo ao excretar ácidos orgânicos como ácido láctico, glicólico, cítrico málico, oxálico e etc.,

e outras substâncias que são responsáveis por dissolver ou quelatar as fontes de fósforo. Muitos microrganismos produzem enzimas fosfatases que disponibilizam por fontes orgânicas de fósforo, anidridos e ésteres de H_3PO_4 (Mendes; Reis Júnior, 2003).

A produção de quitinases assim como o ácido jasmônico atua na redução da herbivoria; o primeiro atua reduzindo a população de pragas de forma ativa por enzimas e o outro atua aumentando as defesas das plantas contra a herbivoria (Taiz; Zeiger, 2013).

Para alguns isolados do gênero *Metarhizium* o triptofano, que é um precursor do AIA, é essencial, já para outros não, para o *M. robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber e para o *M. hummberi* C. Luz, L. Rocha & I. Delalibera, o triptofano é requerido, já para o *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin não há esse requerimento, e sendo estudos, diversas cepas do gênero possuem a capacidade de produzir AIA *in vitro*, ou seja, além da estimulação de produção de auxina pelas plantas e regulação da auxina, ele também pode ter a capacidade de produzir AIA (Siqueira *et al.*, 2020; Xiaohan, 2022); este hormônio é um dos responsáveis por desencadear os processos de desenvolvimento e crescimento das plantas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem dos Isolados

Foram utilizados dois isolados diferentes de *Metarhizium*: *M. brunneum* Petch (ARSEF 1095) e *M. Robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber (ARSEF 2575). Estes isolados foram cedidos pelo Laboratório de Plantas, Solo e Nutrição (Ithaca, NY, EUA), por meio da Agriculture Research Service Collection of Entomopathogenic Fungi (ARSEF).

2.2 Preparo das Suspensões Fúngicas

Os isolados foram cultivados em meio batata dextrose ágar (BDA) e acondicionados em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e 80% de umidade relativa durante 14 dias. Após o crescimento das colônias fúngicas, os conídios foram coletados e adicionados a tubos falcon contendo Tween 80 a 0,1% (v/v) até obter-se a concentração de 1×10^8 conídios mL^{-1} . As suspensões foram quantificadas na câmara de Neubauer. Para avaliar a viabilidade dos conídios, a suspensão foi diluída até 10^5 conídios mL^{-1} e uma alíquota de 20 μL foi adicionada em meio BDA durante 24 horas. Após esse tempo, 10 μL de azul de algodão foram adicionados e as placas levadas ao microscópio óptico para a verificação da germinação dos conídios.

2.3 Inoculação de *Metarhizium robertsii* e *brunneum* em *Vigna unguiculata*

2.3.1. Montagem e condução de experimento em casa de vegetação

O experimento foi implantado na casa de vegetação do departamento de Fitotecnia localizado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), campus Seropédica, no estado do Rio de Janeiro. O clima de Seropédica é tropical atlântico (Aw) segundo a classificação climática de Köppen-Geiger, a 26 metros de altitude.

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados (DIC) com três grupos e 35 repetições cada, totalizando 105 amostras, sendo os seguintes grupos e tratamentos: um grupo tratamento com suspensões fúngicas de *Metarhizium robertsii* (isolado ARSEF 2575); outro grupo tratamento com suspensões fúngicas de *Metarhizium brunneum* (isolado ARSEF 1095); e o grupo Testemunha ou Controle, que corresponde a uma suspensão de Tween a [0,01] %.

Foram utilizadas as sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Costelão, adquiridas na Fazenda Agroecológica na Embrapa e da PESAGRO no ano de 2019. Antes do plantio, as sementes de *V. unguiculata* (L.) Walp, foram selecionadas e esterilizadas superficialmente por imersão em álcool 70% por um período de 60 segundos; logo depois foram submetidas a três lavagens em água destilada estéril.

O substrato de marca comercial BIOMIX foi autoclavado sob temperatura de 120°C e $1,0 \text{ Kg}/\text{cm}^2$ de pressão durante 20 minutos. Os vasos de polietileno (altura de 9,1 cm, diâmetro superior de 12,5 cm e inferior de 9,3 cm e volume de 725 mL) foram preenchidos em uma proporção de 2:1 de substrato e areia, respectivamente. Três sementes foram semeadas nos vasos em uma profundidade de até três vezes o tamanho da semente (cerca de 3,0 centímetros).

Logo após o surgimento das plântulas, foi feito um desbaste para que apenas uma plântula restasse no vaso. Durante o estágio fenológico V2, 3,5 mL de suspensão fúngica

($1,0 \times 10^8$ de conídios mL^{-1}), ou solução de Tween 80 a [0,01] %, foram pulverizados sobre cada uma das plantas e substrato, até o ponto de escorrimento. Após o tratamento, as plantas foram submetidas a uma câmara úmida. Esta câmara consistia em envolver a parte aérea da planta com saco plástico e vedar com barbante, de forma que fosse criado um microambiente de alta umidade, favorecendo a germinação fúngica. Durante a condução do experimento (30 dias) foi realizada a rega manual diária e a manutenção de armadilhas entomológicas.

2.3.2. Avaliação da biomassa e altura das plantas

Para a avaliação da altura inicial das plantas, foi utilizada uma trena métrica para determinar a medida do colo da planta até o primeiro nó (gema apical). As medições ocorreram sete dias após o plantio (estágio V2) (= altura inicial). Para determinar a altura final, as plantas foram medidas 30 dias após o tratamento considerando a medida do último nó da parte aérea da planta até o final da raiz. O incremento de altura foi calculado subtraindo-se a altura final da altura inicial.

Trinta dias após o tratamento, as plantas pertencentes a cada grupo foram lavadas em água corrente para retirar resíduos de substrato e posteriormente secas em papel toalha para retirar o excesso de água. As plantas foram, então, pesadas para obter o peso da massa fresca (MFP). Para obtenção da biomassa seca da planta (MSPS), foi utilizada uma estufa de ventilação forçada a 60°C até que as amostras atingissem massa constante. Sete dias após atingir a massa constante, o peso seco de cada uma das plantas foi registrado em uma balança de precisão. O incremento de biomassa foi obtido por diferença do peso úmido menos o peso seco (Carvalho *et al.*, 2018; Alves, 2019).

Todos os dados foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk para análise da normalidade; depois passaram pela análise de variância (One-Way ANOVA), seguida do teste de Tukey para comparação entre as médias considerando um intervalo de confiança de 5%. As análises foram feitas com software GraphPad Prism versão 8.4.2.

2.3.3. Reisolamento fúngico dos tecidos de *Vigna unguiculata* tratados com fungos entomopatogênicos

Para análise da colonização fúngica nos tecidos das plantas, após implantação do experimento 14 DAP foi feito o tratamento dos grupos com suspensões fúngicas (suspensão com ARSEF 1095 e ARSEF 2575 na concentração de 10^8 conídios/ mL^{-1}) e suspensão com Tween 0,01% (Grupo controle). Foram utilizadas três plantas de cada tratamento (*M. Robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber ARSEF 2575 e *M. brunneum* Petch ARSEF 1095) e três plantas do controle, totalizando nove vasos. Recortes ($\sim 0,5$ cm) de folhas, caules e raízes foram feitos. Os tecidos foram superficialmente desinfecionados e semeados em meio artificial BDA suplementados com CTC (clorofenicol + ciclohexamida e tiamidazol). O reisolamento fúngico ocorreu dez dias após o tratamento (DAT).

A ausência ou presença fúngica (*M. robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber ou *M. Brunneum* Petch) em plantas foi confirmada pela cultura de partes das plantas (raízes, caules e folhas) em meio BDA suplementado com CTC (clorofenicol + ciclo hexamida + tiamidazol) (Fernandes *et al.*, 2010) após desinfecção superficial dos tecidos. A desinfecção superficial das folhas, caules e raízes foi feita pela imersão em hipoclorito de sódio a 0,05% por um minuto, seguida de imersão em etanol a 70% por um minuto. As partes das plantas foram então lavadas com água destilada estéril três vezes. Foi coletado uma alíquota com cinquenta microlitros da

água estéril destilada presente nas placas de cada grupo. A alíquota foi inoculada em meio BDA para verificação da eficácia da desinfecção superficial. A parte externa dos tecidos foi dissecada e descartada (Parsa *et al.*, 2013); já as partes restantes foram cultivadas em CTC.

Nove placas (três réplicas de cada vaso) contendo três fragmentos de folhas, caules ou raízes cada foram incubadas a 28°C. As placas foram examinadas diariamente durante 14 dias e fungos crescidos dos tecidos das plantas foram transferidos e caracterizados morfológicamente de acordo com Humber (1997). Os experimentos foram realizados três vezes totalizando um N de 27 placas e 81 fragmentos por tecido analisado.

Os resultados (placas com tecidos positivos ou não para fungos utilizados nos tratamentos) foram analisados por meio do teste Exato de Fisher considerando $P < 0,05$ e utilizando o GraphPad Prism versão 8.4.2.

2.4 Análise do Desenvolvimento de Raízes em Sementes de *Vigna unguiculata*

O experimento foi conduzido no Laboratório de Controle Microbiano (LCM) da UFRRJ, campus Seropédica, no estado do Rio de Janeiro. As sementes de *Vigna unguiculata* usadas foram da variedade Costelão adquiridas da Fazenda Agroecológica na Embrapa e da PESAGRO, safra do ano de 2019.

O delineamento experimental foi feito em blocos inteiramente casualizados (DIC) com cinco grupos e 50 repetições cada, totalizando 250 amostras, sendo os seguintes grupos e tratamentos: dois grupos tratamento com suspensões fúngicas do isolado ARSEF 2575 em concentrações de 1×10^5 e 10^8 conídios mL^{-1} ; outros dois grupos tratamento com suspensões fúngicas do isolado ARSEF 1095 nas concentrações de 1×10^5 e 10^8 conídios mL^{-1} ; e o grupo controle exposto a uma suspensão de Tween 80 a 0,01%.

O teste foi conduzido em papel “germitest”, esterilizado em autoclave a 120° C durante 20 minutos. As sementes foram esterilizadas em uma solução de hipoclorito a 0,05% durante trinta segundos e álcool 70% durante um minuto e lavadas com água destilada três vezes. Cinquenta sementes foram dispostas em rolos de papel germitest e umedecidas em até 2 a 3 vezes o peso do substrato (papel germitest + 50 sementes). Foi aplicado, ao total, 80 mL de suspensão fúngica para cada grupo (Controle, ARSEF 2575 e ARSEF 1095). Após o 10° dia foi feita a contagem das raízes com desenvolvimento normal seguindo os critérios estabelecidos na regra de análises de sementes utilizando a metodologia descrita nas RAS (2009) de forma adaptada. As sementes contaminadas com outros microrganismos que não *Metarhizium* ou as raízes sem desenvolvimento normal foram consideradas como não desenvolvidas. A medida do comprimento de cada unidade (raiz) foi realizada com um paquímetro digital e os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA).

Todos os dados foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk para análise da normalidade. Os dados foram, então, submetidos à análise de variância (One-Way ANOVA) seguido do teste de Tukey para comparação entre as médias considerando um intervalo de confiança de 5%. As análises foram feitas com software GraphPad Prism versão 8.4.2.

2.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Após a implantação do experimento três grupos de vasos de plantas foram formados; 14 dias após plantio (DAP) foram feitos os tratamentos com as suspensões fúngicas, em que foram pincelados o grupo controle com solução de Tween 0,01% (v/v) e os dois grupos com

tratamentos referentes às suspensões fúngicas na concentração de 1×10^8 conídios mL^{-1} dos isolados ARSEF 2575 e ARSEF 1095.

Para confirmar a associação endofítica entre os isolados fúngicos ARSEF 1095 e ARSEF 2575 com as folhas de feijão caupi (*V. unguiculata* (L.) Walp), estas foram processadas, emblocadas, cortadas e analisadas por MET. Foi utilizada uma planta para cada grupo (ARSEF 2575 e ARSEF 1095) e uma planta do controle, totalizando três vasos. Os grupos formados foram pincelados da seguinte forma: grupo controle com solução de Tween 0,01% (v/v); e os dois grupos com tratamentos referentes às suspensões fúngicas na concentração de 1×10^8 conídios mL^{-1} dos isolados ARSEF 2575 e ARSEF 1095.

Após o tratamento, as plantas foram submetidas a uma câmara úmida (envoltas por saco plástico) durante 24 horas. As folhas foram avaliadas após 14 dias de crescimento e analisadas em 48h, 72h e 92h. Posteriormente, foram feitos três recortes com tesouras esterilizadas no limbo foliar. Os pedaços de folhas foram coletados com pinças previamente esterilizadas e adicionados a um tubo eppendorf com 500 μL de fixador glutaraldeído (2,5%) diluído em solução tampão cacodilato de sódio em 0,1 M em pH 7,2.

Após colocar no fixador, as amostras foram mantidas sob refrigeração (4°C) até serem processadas. As amostras foram lavadas com o tampão cacodilato de sódio 0,1M três vezes, sendo a primeira lavagem durante trinta e as outras duas lavagens durante vinte minutos para cada lavagem. Após a lavagem, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% durante uma hora. Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio (0,1M) três vezes, com duração de 15 minutos cada lavagem. Em seguida, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, para cada concentração 30, 50, 70, 90 e (3x) 100% durante 15 minutos cada. Após a desidratação, foi realizada a infiltração lenta em resina LR WHITE. Primeiro as amostras foram infiltradas com solução na proporção de 2:1 (2 partes de acetona:1 parte resina) durante 24h. Após, a solução anterior foi retirada e adicionada a solução na proporção 1:1 (1 parte de acetona: 1 parte de resina) durante 16h. Após esta última, foi retirada e adicionada a solução na proporção de 1:2 (1 parte de acetona: 2 partes de resina) durante 12 horas. A próxima etapa foi a adição de resina pura por 24 horas, retirada e inclusão em resina pura por mais 24 horas. Após esse período as amostras foram emblocadas em resina LR WHITE e, em seguida, foram levadas à estufa durante 72 horas a 68°C . O processamento das amostras foi feito através da metodologia de Karnovsky (1965) modificada.

Após preparadas, as amostras foram cortadas em lâminas ultrafinas, com o auxílio de um ultramicrotomo. As lamínulas foram colocadas em lâminas de cobre onde foi adicionado o contraste de $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (Acetato de Uranila) a 2% e citrato de chumbo ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_{14}\text{Pb}_3$) a 0,2% e, em seguida, analisadas em microscopia eletrônica de transmissão através do microscópio Jeol JEM-1011.

3 RESULTADOS

3.1 Viabilidade dos Isolados Fúngicos

Os isolados de *M. robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber (ARSEF 2575) e *M. Brunneum* Petch (ARSEF 1095) apresentaram viabilidade média de 92% e 95,3% de viabilidade dos conídios, respectivamente. Este resultado indica que as suspensões estavam aptas para uso.

3.2 Avaliação de Incremento de Biomassa e Altura

Em relação à biomassa, ambos os grupos tratados com fungo apresentaram média de peso menor que as plantas do controle (plantas sem tratamento) ($P < 0,05$). A média do peso das plantas não tratadas foi de $10,4 \pm 2,3$ g, enquanto a média do peso das plantas tratadas com o isolado ARSEF 2575 foi de $9,3 \pm 2,3$ g e com o isolado ARSEF 1095 foi de $9,1 \pm 1,7$ g. Os grupos tratados com fungo não diferiram entre si ($P \geq 0,05$) (Figura 1).

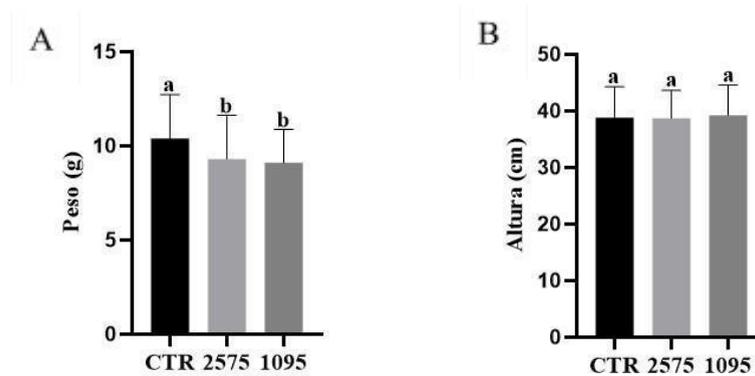


Figura 1: Média e desvio padrão do incremento de biomassa (g) e altura (cm) de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. tratadas ou não com fungos entomopatogênicos. (A) Incremento de biomassa. (B) Incremento de altura. (CTR): grupo de plantas não tratadas com o fungo. (2575): plantas tratadas com o isolado ARSEF 2575. (1095): plantas tratadas com o isolado ARSEF 2575. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos de acordo com one-way ANOVA seguida do teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.3 Reisolamento Fúngico dos Tecidos de *Vigna unguiculata* Tratados com Fungos Entomopatogênicos

Após implantação do experimento, foi confirmada colonização endofítica dez dias após o tratamento pela cultura de partes das plantas previamente esterilizadas na superfície. O grupo de plantas não tratadas com os isolados (grupo controle) não apresentou crescimento de fungo entomopatogênico após cultivo em placas contendo meio artificial BDA suplementado com CTC (clorofenicol + tiamidazol + ciclohexamida) (Fernandes *et al.*, 2010). Nos tecidos provenientes dos grupos tratados com os isolados ARSEF 1095 e ARSEF 2575, o crescimento

fúngico foi observado em todas as partes das plantas (raízes, caules e folhas) 14 dias após o plaqueamento (Figura 2).

As culturas fúngicas isoladas dos tecidos das plantas que foram plaqueadas posteriormente e caracterizadas morfológicamente de acordo com Humber (1997) indicam que em todos os casos as características morfológicas foram consistentes com as características de isolados de *Metarhizium* spp.

O percentual de placas positivas contendo tecidos colonizados por fungos entomopatogênicos foi analisado conforme apresentado na Tabela 1. Não houve diferença estatística ($P \geq 0,05$) entre os grupos de plantas tratadas com o isolado ARSEF 2575 (*M. robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber) e o isolado ARSEF 1095 (*M. brunneum* Petch).



Figura 2: Exemplos representativos da colonização fúngica de diferentes espécies de *Metarhizium* em feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). (A) Caules de planta tratada com *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber (ARSEF 2575). (B) Caules de planta tratada com *Metarhizium brunneum* Petch (ARSEF 1095). (C) Caules de plantas do grupo controle (sem tratamento fúngico). (D) Raízes de planta tratada com o isolado ARSEF 2575. (E) Raízes de planta tratada com *Metarhizium brunneum* ARSEF 1095. (F) Raízes de plantas do grupo controle. (G). Folhas de planta tratada com *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber (ARSEF 2575). (H) Folhas de plantas tratada com *Metarhizium brunneum* Petch (ARSEF 1095). (I) Folhas de plantas do grupo controle.

Tabela 1: Percentual de placas contendo tecidos de *Vigna unguiculata* colonizados por fungos entomopatogênicos

Isolado fúngico	Placas com tecido(s) positivo(s) para <i>Metarhizium</i>		
	Caule	Raiz	Folha
ARSEF 2575	88,89% (24/27) a	59,26% (16/27) a	100% (27/27) a
ARSEF 1095	70,37% (19/27) a	48,15% (13/27) a	96,3% (26/27) a

Legenda: Percentuais seguidos da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente de acordo com o teste Exato de Fisher ($P \geq 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

3.4 Análise do Desenvolvimento de Raízes em Sementes de *Vigna unguiculata*

A Tabela 2 traz os resultados da análise da germinação de sementes de *V. unguiculata* dez dias após tratamento com as suspensões fúngicas de *Metarhizium* spp. (ARSEF 2575 ou ARSEF 1095). É possível observar que o ARSEF 1095 teve um menor percentual de desenvolvimento de sementes com raízes quando comparado com o fungo ARSEF 2575 na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} .

Em relação ao comprimento das raízes, o grupo ARSEF 2575 na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} ($n=35/50$) apresentou a maior média de comprimento, com o valor de $16,03 \pm 4,53$ cm. Este grupo diferiu estatisticamente do grupo de sementes controle, que apresentou média de comprimento de $12,76 \pm 3,93$ cm ($n=45/50$). Os grupos de sementes tratadas com as suspensões ARSEF 1095 na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} ($11,83 \pm 2,56$ cm) ($n=47/50$) e ARSEF 2575 na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} ($10,6 \pm 1,95$ cm) ($n=45/50$) apresentaram crescimento de raiz estatisticamente inferior ao grupo ARSEF 2575 10^5 conídios mL^{-1} , mas não diferiram do grupo controle ($P \geq 0,05$). O grupo com pior desempenho foi o ARSEF 1095 tratado com a concentração de 10^5 conídios mL^{-1} ($8,46 \pm 2,18$ cm) ($48/50$), diferindo estatisticamente do comprimento da raiz do grupo controle (Figura 3).

Tabela 2: Análise da germinação de sementes de *Vigna unguiculata* dez dias após tratamento com suspensão fúngica de *Metarhizium* spp.

Grupo	Concentração	Sementes com raízes		
		Desenvolvidas	Não desenvolvidas	Sementes contaminadas
Controle	- (50)	45	2	3
ARSEF 2575	10^5 (50)	35	9	6
ARSEF 1095	10^8 (50)	45	5	-
ARSEF 2575	10^8 (50)	48	1	1
ARSEF 1095	10^5 (50)	47	3	-

Legenda: n amostral ($n=50$).

Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

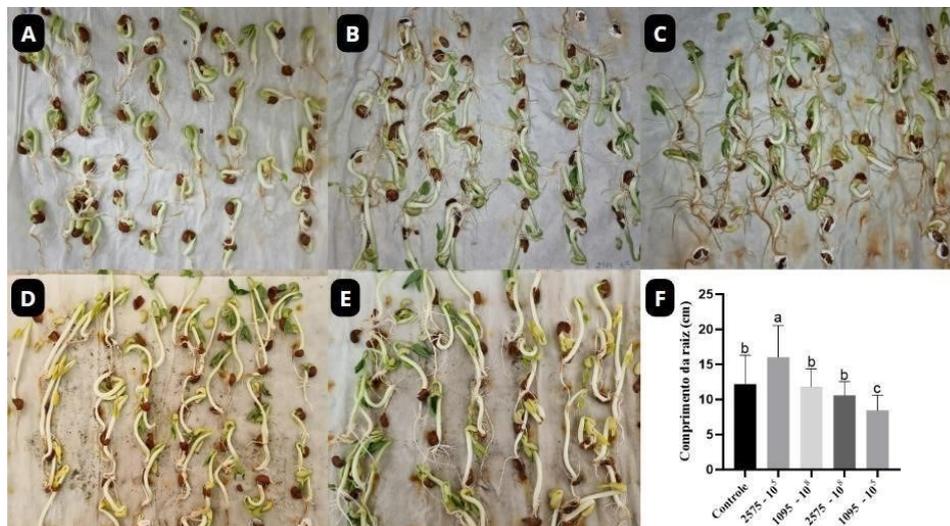


Figura 3: Análise do comprimento das raízes nos diferentes grupos testados (controle e tratamentos com fungos entomopatogênicos) em teste de germinação adaptado. (A) Sementes tratadas com ARSEF 1095 na concentração de 10^5 conídios/mL, (B) Sementes com suspensão aquosa com ARSEF 2575 na concentração de 10^5 conídios/mL, (C) Sementes com suspensão aquosa com Tween 0,01% (Controle), (D) Sementes tratadas com AREF 1095 na concentração 10^8 conídios/mL, (E) Sementes tratadas com ARSEF 2575 na concentração 10^8 conídios/mL, (F) Número médio e desvio padrão da germinação de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp tratadas com suspensões de Arsef 1095 e ARSEF 2575 em diferentes concentrações. Ambos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro – Wilk. Letras diferentes indica diferença estatística entre os tratamentos de acordo com one – way ANOVA seguida do teste de Tukey ($P < 0,05$)

3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de Folhas de *Vigna unguiculata*

A Figura 4 é uma prancha com figuras de folhas de feijão caupi (*V. unguiculata*) do grupo controle (grupo não exposto ao fungo) e as Figuras 5 e 6 são exemplos de folhas de plantas dos grupos tratados com o fungo ARSEF 1095 e ARSEF 2575, respectivamente. Após análise das imagens obtidas não foi possível detectar a presença dos fungos nas folhas.

Grupo controle (Tween 0,01%)

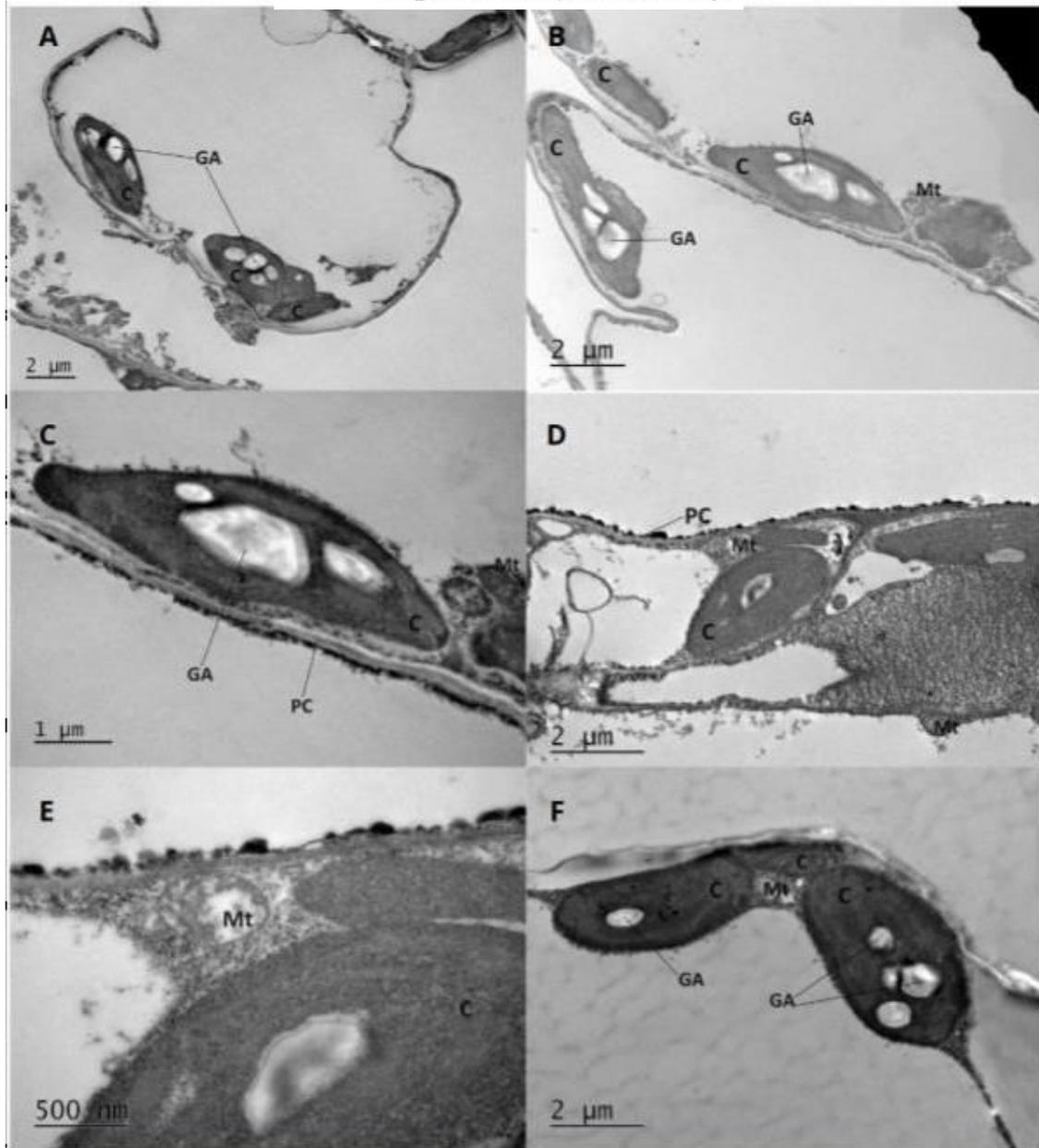


Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão de folhas de *Vigna unguiculata* sem tratamento fúngico (grupo controle). (A, B e C) Folhas 48 horas após aplicação da solução Tween 80 a 0,01. (D e E) Folhas 72 horas após aplicação da solução de Tween 80. (F) Folha 92 horas após aplicação do Tween 80. Cl – Cloroplasto, GA- Grão de amido, PC – Parede celular, Mt – Mitocôndria.

ARSEF 1095 (*M. brunneum* Petch) $1,0 \times 10^8$
conídios/mL.

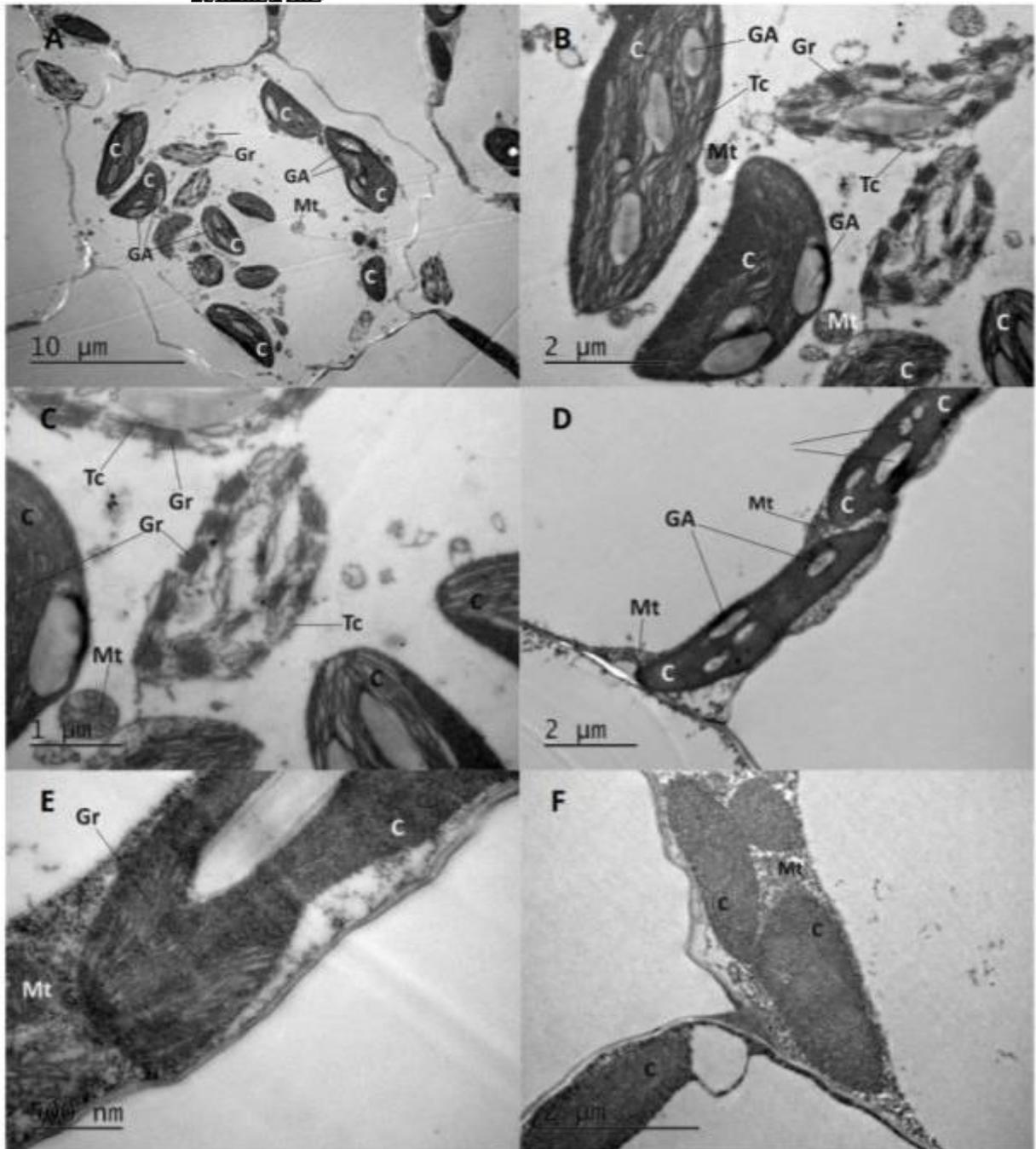


Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão de folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp tratadas com *Metarhizium brunneum* ARSEF 1095 na concentração de 1×10^8 conídios.mL⁻¹. (A, B e C). Folhas 48 horas após a inoculação fúngica. (D) Folha 72 horas após a inoculação fúngica. (E e F). Folhas 92 horas após a inoculação fúngica. C – Cloroplasto, Gr – Granum, Tc – Tilacóide e Mt – Mitocôndria.

ARSEF 2575 (*M. robertsii*) $1,0 \times 10^8$ conídios/mL

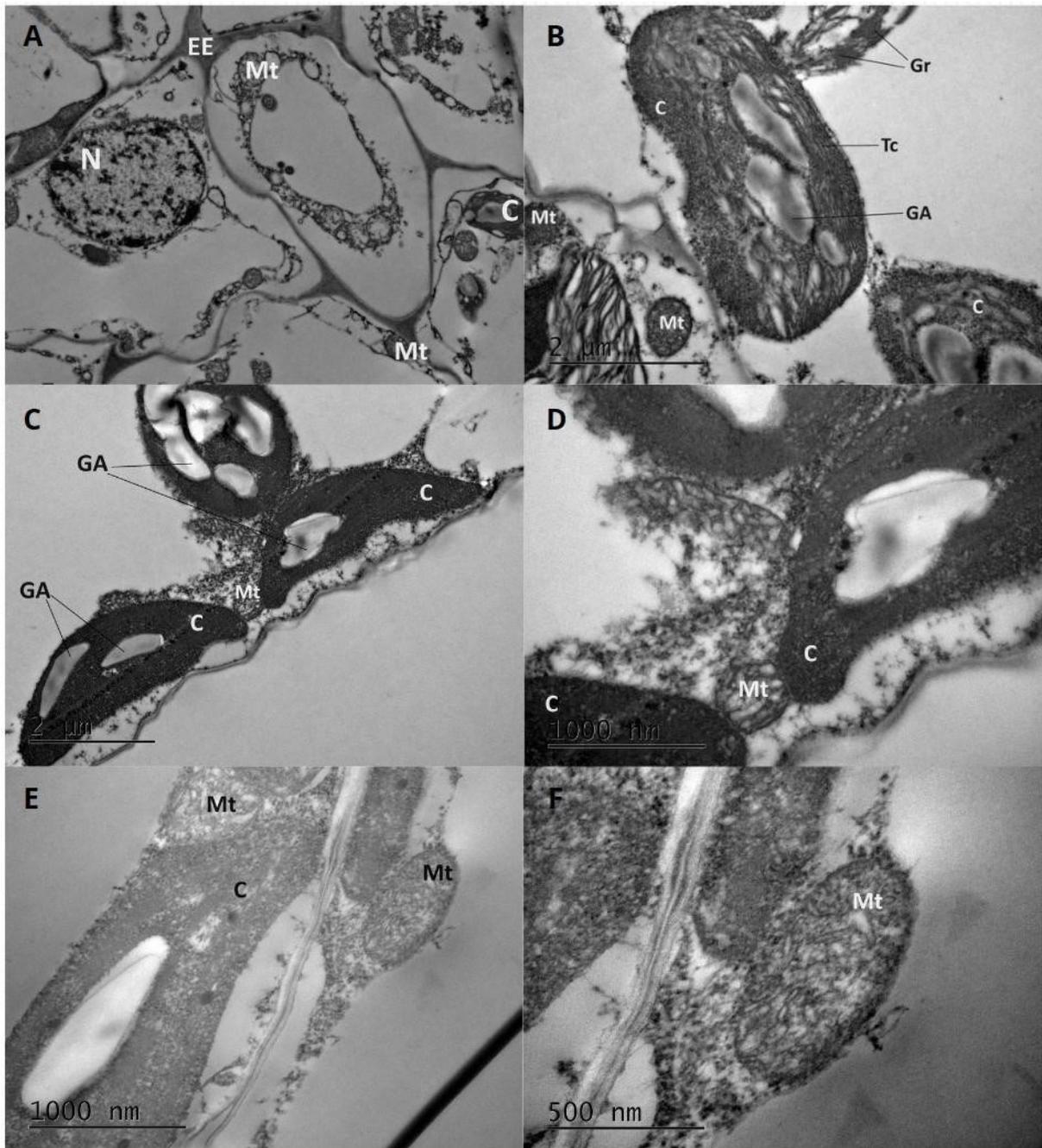


Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão de folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp tratadas com *Metarhizium robertsii* isolado ARSEF 2575 concentrações de 1×10^8 conídios mL⁻¹. (A e B) Folhas 48 horas após a inoculação fúngica. (C e D). Folhas 72 horas após a inoculação fúngica. (E e F) Folhas 92 horas após a inoculação fúngica. C – Cloroplasto, N – núcleo, GA – grão de amido, Tc - Tilacóide, EE – espaço extracelular e Mt – Mitocôndria

4 DISCUSSÃO

Fungos endofíticos são capazes de colonizar o interior das plantas. *Metarhizium* e outros fungos utilizados no controle biológico de ácaros e insetos estão sendo cada vez mais visados para a indústria de bioinsumos devido ao seu potencial bioestimulante. O processo de penetração de fungos entomopatogênicos no artrópode ou em plantas passa pela atuação de adesinas. Para *Metarhizium* são descritas as proteínas MAD1 e MAD 2 (*Metarhizium* adesin 1 e 2). Estas proteínas são responsáveis pelo processo de penetração, pois auxiliam o conídio a se prender no substrato, sendo que MAD2 está ligada particularmente à adesão do fungo a tecidos vegetais (Barelli *et al.*, 2016). A literatura reporta ainda que *M. robertsii* produz os dois tipos de adesina, sendo capaz de colonizar tanto plantas quanto animais (Sasan; Bidochka, 2012). No presente estudo, o resultado do experimento de reisolamento fúngico em meio de cultura artificial indica que ambos os fungos foram capazes de colonizar *V. unguiculata*. Ainda, o método de inoculação utilizado (aspersão da suspensão fúngica nas folhas e caules das plantas) mostrou-se eficaz para o estabelecimento endofítico de ambos os isolados, tendo em vista os resultados encontrados na Figura 2.

No presente estudo, a análise da presença dos fungos nas folhas, caules e raízes mostrou que não houve diferença estatística quando um mesmo tecido da planta foi comparado entre os dois tratamentos fúngicos (Tabela 1). Este resultado dá suporte à hipótese de que o método de inoculação escolhido para os fungos foi eficaz na inoculação de *V. unguiculata*. É possível observar ainda que as folhas e os caules apresentaram maior número de pedaços positivos para o fungo do que em raízes (Tabela 1). Isto pode ser explicado pelo método de inoculação fúngica utilizado, que foi o de aspersão na parte aérea da planta, e não inundação do solo ou inoculação pela raiz, o qual tende a contribuir mais para a presença do fungo nas raízes e caules da planta.

Diferente da hipótese inicial e do que foi descrito por Sasan e Bidochka (2012), Bamisile *et al.* (2018) e Ahmad *et al.* (2020), o presente estudo reporta pela primeira vez que não houve incremento de biomassa e de altura de feijão caupi inoculado com os isolados de *Metarhizium*. Ao contrário do esperado, os tratamentos com ARSEF 2575 e ARSEF 1095, além de não proporcionarem incremento de biomassa nas plantas, causaram uma redução no peso destas, assim como foi descrito por Amandio (2022). Neste trabalho, o autor reporta os efeitos de vários isolados de *Metarhizium* sobre a forrageira *Urochloa brizantha* (= *Brachiaria brizantha*). Apesar de alguns isolados se mostrarem promissores, outros, como o famoso isolado de *Metarhizium* E9, causaram redução na altura e na massa fresca e seca das folhas e raízes das plantas (Amandio, 2022). Outro estudo que analisou a interação entre morango (*Fragaria xananassa*) e fungos entomopatogênicos reportou que mesmo usando o mesmo isolado fúngico, o efeito do fungo na planta pode variar de acordo com a cultivar (Canassa *et al.*, 2020). Apesar dos poucos estudos disponíveis, o efeito antagonista de fungos entomopatogênicos endofíticos é frequentemente atribuído à produção de metabólitos secundários ou a indução de respostas sistêmicas nas plantas colonizadas (Amandio, 2022).

No presente estudo, embora a análise de incremento de massa e altura não tenham apresentado um resultado positivo após o tratamento fúngico, a análise do desenvolvimento das raízes em sementes mostrou um resultado muito promissor para o isolado ARSEF 2575 de *M. robertsii* em concentrações menores (10^5 conídios/mL) do que as usadas para a inoculação das plantas. O mesmo resultado não foi observado para o isolado ARSEF 1095 de *M. brunneum* (Figura 3), principalmente na concentração 10^5 conídios/mL, podendo ser um erro durante a manipulação. A literatura reporta que a espécie *M. robertsii* possui competência rizosférica e

capacidade endofítica (Golo *et al.*, 2014), mas o efeito de diferentes concentrações deste fungo no desenvolvimento de raízes de sementes inoculadas ainda não havia sido estudado. Os resultados do presente estudo sugerem que, além do isolamento fúngico, a concentração de propágulos da suspensão pode nortear o efeito antagonista ou benéfico para o desenvolvimento da semente. Corroborando com a hipótese de que a escolha do isolado fúngico é importante, Wyrebek (2011) descreve sobre a compatibilidade entre a planta e o microrganismo e ser inoculado, uma vez que a planta pode produzir exsudatos que têm efeito atrativo para a sua rizosfera.

Um dos métodos mais usados para a inoculação de microrganismos é a inoculação via semente (Alencar, 2017; Lopes, 2021). A inoculação é uma forma de fazer com que os microrganismos colonizem ou entrem em contato com o tecido das plantas compatíveis (Lopes, 2021). Para garantir a produtividade, o vigor e a germinação das sementes são determinantes. Técnicas que favorecem o desenvolvimento da semente, como a inoculação, co-inoculação, microbiolização e outras técnicas envolvendo a interação da planta com microrganismos, podem aumentar o desempenho das sementes (Alencar, 2017). O tratamento de sementes permite que haja maior uniformidade, e favorece a planta em uma das fases essenciais e sensíveis que é a germinação, auxiliando a planta ao conferir resistência aos estresses bióticos e abióticos (Alencar, 2017). *Metarhizium* spp. é um fungo que pode ser inoculado em plantas através de folhas ou de sementes (Vega, 2018). Silva (2021) realizou estudo com couve (*Brassica oleracea*), pulgão (*Brevicoryne brassicae*) e fungos entomopatogênicos. Todos os fungos mostraram atividade endofítica e eficiência na redução dos pulgões após inoculação da planta, independentemente do método de inoculação; contudo, alguns isolados, incluindo uma cepa comercial de *M. anisopliae* (Metschn.) Sorokīn, mostraram maior eficácia quando inoculados na semente.

Lahey *et al.* (2020) estudaram a interação de isolados dos fungos *M. brunneum* e *M. robertsii* na atividade endofítica em milho e feijão. Neste trabalho, ambos os fungos (*M. brunneum* e *M. robertsii*) colonizaram preferencialmente o hipocótilo, porém foi observada maior colonização do rizoplano nas regiões proximais ao hipocótilo em ambas as plantas. A maior associação radicular ocorreu com *M. brunneum* e milho. No presente estudo, a submersão de sementes com concentrações abaixo das usadas para controle biológico mostrou-se eficaz para *M. robertsii* e feijão caupi, mas não para *M. brunneum* e a mesma planta. Altas concentrações de fungos entomopatogênicos são requeridas a nível de campo para controle de pragas artrópodes principalmente devido aos entraves abióticos (baixa umidade, altas temperaturas e elevada irradiação UV); no entanto, baseado no presente trabalho, sugere-se que para determinados isolados, possivelmente concentrações mais baixas, devem ser usadas se o objetivo é usar o fungo entomopatogênico como um bioinsumo inoculante.

Na análise das folhas por microscopia eletrônica de varredura foi possível identificar as estruturas internas das folhas como cloroplasto, grãos de amido, parede celular, mitocôndria e núcleo celular (Figuras 4-6). As estruturas apresentadas na análise de MET do presente estudo correspondem com a morfologia esperada para estas organelas, de acordo com trabalhos previamente publicados (Carvalho *et al.*, 2011). Embora haja sugestão da internalização fúngica três dias após a inoculação devido ao resultado do ensaio de reisolamento, não foi possível detectar a presença de estrutura fúngica nos tecidos analisados (Figuras 5 e 6) nas imagens de MET. Aparentemente, a organização das organelas não foi alterada com a presença fúngica.

5 CONCLUSÕES

- A aspersão da parte aérea da planta é eficaz para a inoculação de *M. robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber (ARSEF 2575) e *M. brunneum* Petch (ARSEF 1095) em *V. unguiculata*.
- Os isolados de *M. robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber (ARSEF 2575) e *M. brunneum* Petch (ARSEF 1095) não causaram incremento de altura ou biomassa em *V. unguiculata* cv. Costelão inoculado com suspensão fúngica.
- A inoculação do isolado *M. robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber (ARSEF 2575) em sementes de *V. unguiculata* (L.) Walp na concentração 1×10^5 conídios/mL estimula o desenvolvimento das raízes, indicando que o ARSEF 2575 é um bioinsumo potencial promotor de crescimento.
- A inoculação do isolado ARSEF 1095 de *M. brunneum* Petch em sementes de *V. unguiculata* (L.) Walp nas concentrações 1×10^5 conídios/mL retarda o desenvolvimento das raízes.
- O método de inoculação fúngica de *M. robertsii* e *M. brunneum* por meio da submersão de sementes de *V. unguiculata* (L.) Walp cv. Costelão mostrou-se eficaz.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I. *et al.* Endophytic *Metarhizium robertsii* promotes maize growth, suppresses insect growth, and alters plant defense gene expression. **Biological Control**, [s. l.], n. 104167, 2020. Disponível em: <https://doi:10.1016/j.biocontrol.2019.104167>. Acesso em: 21 mar. 2024.

ALENCAR, B. N. **Uso de bioestimulante em sementes de milho cv. Cruiser**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, Campus Petrolina Zona Rural, Petrolina, 2017.

ALEXANDRE, T. M. *et al.* Efeito da Temperatura e Cama do Aviário na Virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) para o Controle do Cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: *Tenebrionidae*). **Neotropical Entomology**, [s. l.], v. 35, p. 75-82, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ne/a/v7P4MHYYYGYb6vw566KxZFp/?lang=pt>. Acesso em: 21 mar. 2024.

ALVES, G. S. **Fungos promotores do crescimento do feijoeiro, micorriza arbuscular e atributos bioquímicos do solo**. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1297>. Acesso em: 21 mar. 2024.

ALVES, G. S. *et al.* Fungal endophytes inoculation improves soil nutrient availability, arbuscular mycorrhizal colonization and common bean growth. **Rhizosphere**, [s. l.], v. 18, p. 100330, 2021.

ALVES, R. T.; FARIAS, M. Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos. **Embrapa Cerrados**, Planaltina, n. 286, mar. 2010. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/77782/1/doc-286.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2024.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de inseto**. São Paulo: Fealq, 1998.

AMANDIO, D. T. T. **Avaliação de isolados de *Metarhizium* spp. (*Ascomycota: Hypocreales*) nativos de Santa Catarina na promoção de crescimento de gramíneas (*Poacea*) forrageiras e antagonismo a *Spodoptera frugiperda* (*Lepidoptera: Noctuidae*)**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro fino: Agronômica Ceres, 2018.

ANTONIOLLI, Z. I.; KAMINSKI, J. Micorrizas. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 21 n. 3, p. 441-455, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84781991000300013>. Acesso em: 21 mar. 2024.

ARRUDA, W. **Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Mmetarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *boophilus microplus***. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/6912>. Acesso em: 21 mar. 2024.

BAMISILE, B. S. *et al.* Fungal endophytes: beyond herbivore management. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v. 9, p. 544, 2018.

BAMISILE, B. S. *et al.* Mutualismo patogênico de insetos endofíticos – planta hospedeira herbívoro: elucidando os mecanismos envolvidos nas interações tripartites. **Mundo J Microbiol Biotechnol**, [s. l.], v. 39, n. 12, 2023. Disponível em: <https://doi:10.1007/s11274-023-03780-4>. pmid:37776438. Acesso em: 21 mar. 2024.

BARBOSA, B. B. **Propriedades biológicas e químicas de solos arenoso e argiloso tratados com isolados fúngicos sob soja e milho em casa-de-vegetação**. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021. Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.5558>. Acesso em: 26 jan. 2024.

BARELLI, L. *et al.* Fungos com estilos de vida multifuncionais fungos patogênicos de insetos endofíticos. **Planta Mol Biol**, [s. l.], n. 90, p. 657-664, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0413-z>. Acesso em: 26 jan. 2024.

BEHIE, S. W.; BIDOCHKA, M. J. Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: An additional branch of the soil nitrogen cycle. **Applied and environmental microbiology**, [s. l.], v. 80, n. 5, p. 1553-1560, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.03338-13>. Acesso em: 26 jan. 2024.

BEHIE, S. W.; JONES, S. J.; BIDOCHKA, M. J. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. **Fungal Ecology**, [s. l.], v. 13, p. 112-119, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/267275181_Plant_tissue_localization_of_the_endophytic_insect_pathogenic_fungi_Metarhizium_and_Beauveria. Acesso em: 21 mar. 2024.

BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. **Mycologia**, [s. l.], v. 98, n. 5, p. 737-745, 2006. Disponível em: [Doi:10.3852/mycologia.98.5.737](https://doi.org/10.3852/mycologia.98.5.737). Acesso em: 21 mar. 2024.

BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **PubMed**, [s. l.], v. 101, n. 4, p. 512-530, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19623931/>. Acesso em: 21 mar. 2024.

BRASIL. **Decreto n.º 10.375, de 26 de Maio de 2020**. Institui o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos. Brasília: Planalto, 2020. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019/2022/2020/decreto/d10375.htm. Acesso em: 21 mar. 2024.

BRASIL. **Decreto n.º 4.074 de 04 de janeiro de 2002**. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 [...]. Brasília: Planalto, 2002. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm. Acesso em: 21 mar. 2024.

BRUNNER-MENDOZA, Carolina *et al.* A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico.

Biocontrol Science and Technology, v. 29, n. 1, p. 83-102, 2018. DOI: 10.1080/09583157.2018.1531111.

BOLDO, J. T. *et al.* Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. **Current Genetics**, [s. l.], v. 55, p. 551-560, 2009. Disponível em: <https://doi:10.1007/s00294-009-0267-5>. Acesso em: 21 mar. 2024.

[s. l.], v. 55, p. 551-560, 2009. Disponível em: <https://doi:10.1007/s00294-009-0267-5>. Acesso em: 21 mar. 2024.

CANASSA, F. *et al.* Effects of bean seed treatment by the entomopathogenic fungi *M. robertsii* and *Beauveria bassiana* on plant growth, spider mite populations and behavior of predatory mites. **Biological Control**, [s. l.], v. 132, p. 199-208, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964418306030>. Acesso em: 21 mar. 2024.

CANASSA, F. *et al.* Fungal isolate and crop cultivar influence the beneficial effects of root inoculation with entomopathogenic fungi in strawberry. **Pest Manag Sci.**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 1472-1482, 2020. Disponível em: <https://doi:10.1002/ps.5662>. Acesso em: 21 mar. 2024.

CARVALHO, A. D. O. *et al.* Ultrastructural changes during early infection of *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris* leaves by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and an unexpected association between chloroplast and mitochondrion. **Acta physiologiae plantarum**, [s. l.], v. 33, p. 2025-2033, 2011. Disponível em: <https://doi:10.1007/s11738-0110726-8>. Acesso em: 21 mar. 2024.

CARVALHO, R. C. D. **Consórcio de cinco fungos promovendo o crescimento vegetal e a colonização micorrízica arbuscular na soja**. 2018. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/22456>. Acesso em: 21 mar. 2024.

CHUQUIRUNA, H. A.; KRUGG, J. W. Adsorción de iones cúprico y plumboso por *Trichoderma viride* FP-UNT 01 a partir de soluciones ideales. **Revista rebiolest**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 12-19, 2014. Disponível em: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/ECCBB/article/view/748>. Acesso em: 21 mar. 2024.

CLARKSON, J. *et al.* Fungal pathogenesis in insects. In: BRIDGE, Paul; COUTEAUDIER, Yvonne; CLARKSON, John. **Molecular variability of fungal pathogens**. Wallingford: CABI, 1998. p. 83-94.

COCHRANE, V. W. **Physiology of fungi**. New York: John Wiley and Sons, 1958.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**. Brasília, v. 11, safra 2023/24, n. 3, terceiro levantamento, 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 21 mar. 2024.

DEUNER, C. *et al.* Ácido jasmônico como promotor de resistência em plantas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 275-281, 2015. Disponível em: <https://revistas.rcaap.pt/rca/article/view/16931>. Acesso em: 21 mar. 2024.

DRIVER, Felice; MILNER, Richard J.; TRUEMAN, John WH. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological research**, [s. l.], v. 104, n. 2, p. 134-150, 2000.

EMBRAPA. Feijão caupi. **Embrapa**, Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/feijao-caupi>. Acesso em: 21 mar. 2024.

EMBRAPA. Bioinsumos: Tendência de crescimento no Brasil. **Embrapa**, Brasília, 8 dez. 2023a. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/85620702/bioinsumos-tendencia-de-crescimento-no-brasil>. Acesso em: 21 mar. 2024.

EMBRAPA. **Dados conjunturais da produção de feijão comum (*Phaseolus vulgaris L.*) e caupi (*Vigna unguiculata (L.) Walp*) no Brasil (1985 a 2022): área, produção e rendimento**. Brasília: CNPAF, 2023b. Disponível em: https://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/docs/feijao/dadosConjunturais_feijao_brasil.htm. Acesso em: 12 mar. 2024.

FARIAS, C. P. **Fungos promotores do crescimento vegetal e da fitorremediação de metais pesados em combinação com biochar**. 2018. 87 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018. Programa de Pós-graduação em Qualidade Ambiental. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/21212>. Acesso em: 21 mar. 2024.

FERNANDES, E. K. K. *et al.* CTC medium: A novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, [s. l.], v. 54, p. 197-205, 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/47684361_CTC_medium_A_novel_dodine-free_selective_medium_for_isolating_entomopathogenic_fungi_especially_Metarhizium_acridum_from_soil. Acesso em: 21 mar. 2024.

FERREIRA, C. C. B.; LIMA, S. O. L. O.; ROSANOVA, C. Biotecnologia: Aplicação da inovação tecnológica a favor do desenvolvimento por meio do uso de organismos geneticamente modificados. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE GESTÃO, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO (EIGEDIN), 4., Naviraí, 2020. **Anais...** Naviraí:

UFMG, 2020. n. 1. Disponível em: <https://periodicos.ufms.br/index.php/EIGEDIN/article/view/11108>. Acesso em: 21 mar. 2024.

FONTES, E. M. G.; VALADARES INGLIS, M. C. **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília: Embrapa, 2020.

FREIRE, F. R. *et al.* **Feijão-caupi no Brasil**: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011.

FREIRE, F. R. *et al.* **Feijão-Caupi na Embrapa Meio-Norte**: melhoramento, cultivares lançadas, genealogias e base genética Brasília: Embrapa, 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1156685/fejao-caupi-na-embrapa-meio-norte-melhoramento-cultivares-lancadas-genealogias-e-base-genetica>. Acesso em: 21 mar. 2024.

FREIRE, F. R. F.; QUEIROZ, V. **Feijão-Caupi na Embrapa Meio-Norte**: melhoramento, cultivares lançadas, genealogias e base genética. Brasília: Embrapa, 2023.

FREITAS, A. C. **Importância socioeconômica** – Feijão Caupi. Portal Embrapa, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/fejao-caupi/pre-producao/socioeconomia/importancia-socioeconomica>. Acesso em: 11 mar. 2024.

FRIGO, S. M.; AZEVEDO, J. L. D. Meios de cultura e produção de conídios em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) sorokin. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v. 43, n. 1, p. 285-293, 1986. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aesalq/a/kVCFRCNYnvB9VJmNzNhDPTd/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 13 mar. 2024.

GAO, Qiang *et al.* Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. **PLoS genetics**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. e1001264, 2011.

GOLO, P. S. *et al.* Production of destruxins from *Metarhizium* spp. fungi in artificial medium and in endophytically colonized cowpea plants. **PloS one**, [s. l.], v. 9, n. 8, 2014.

GOMES, E. A. *et al.* Microrganismos promotores do crescimento de plantas. **Embrapa Milho e Sorgo**, 2016. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1063799>. Acesso em: 21 mar. 2024.

GUTIERREZ, A. C. *et al.* Natural occurrence in Argentina of a new fungal pathogen of cockroaches, *Metarhizium argentinense* sp. nov. **Fungal biology**, [s. l.], v. 123, n. 5, p. 364-372, 2019. Disponível em: <https://doi:10.1016/j.funbio.2019.02.005>. Acesso em: 21 mar. 2024.

HUMBER, R. A. Fungi: identification. *In*: LACEY, L. A. (ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. Washington: Academic press, 1997. p. 153-185.

HUSSEIN, K. A.; HASSAN, S. H.; JOO, J. H. Potential capacity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the biosorption of Cd²⁺ and Pb²⁺. **The Journal of General and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 57, n. 6, p. 347-355, 2011. Disponível em: <https://doi:10.2323/jgam.57.347>. Acesso em: 21 mar. 2024.

JABER, L. R.; ARAJ, S. E. Interactions among endophytic fungal entomopathogens (Ascomycota: *Hypocreales*), the green peach aphid *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: *Aphididae*), and the aphid endoparasitoid *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: *Braconidae*). **Biological Control**, [s. l.], v. 116, p. 53-61, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/321419501_Interactions_among_endophytic_fungal_entomopathogens_Ascomycota_Hypocreales_the_green_peach_aphid_Myzus_persicae_Sulzer_Homoptera_Aphididae_and_the_aphid_endoparasitoid_Aphidius_colemani_Viereck_Hymen. Acesso em: 21 mar. 2024.

JONES, S. *et al.* Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. **Fungal Ecol**, v. 13, p. 112-119, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/267275181_Plant_tissue_localization_of_the_endophytic_insect_pathogenic_fungi_Metarhizium_and_Beauveria. Acesso em: 21 mar. 2024.

KHAN, A. L. *et al.* Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. **World Journal Microbiology Biotechnology**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 1.483-1.494, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0950-9>. Acesso em: 21 mar. 2024.

KIRIACHEK, S. G. *et al.* Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 1, p. 1-16, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832009000100001>. Acesso em: 21 mar. 2024.

KLEPER, R. M. *et al.* Esclarecimento dos limites genéricos e de espécies para *Metarhizium* e fungos relacionados por meio de filogenética multigênica. **Mycologia**, [s. l.], p. 811-829, 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/262813194_Kepler_RM_Humber_RA_Bischoff_JF_Rehner_SA_Clarification_of_generic_and_species_boundaries_for_Metarhizium_and_related_fungi_through_phylogenetics_Mycologia. Acesso em: 21 mar. 2024.

JONES, Giselle Arieiro. **Seleção de isolados de *Metarhizium* spp. para o controle do carrapato *Rhipicephalus microplus***: ensaios in vitro da virulência e conidiogênese. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

LAHEY, S. *et al.* Localization of the insect pathogenic fungal plant symbionts *Metarhizium robertsii* and *Metarhizium brunneum* in bean and corn roots. **Fungal biology**, [s. l.], v. 124, n. 10, p. 877-883, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32948275/>. Acesso em: 21 mar. 2024.

LANZA, L. M. A.; EUCLIDES, C. M. B. Sensibilidade de *Metarhizium anisopliae* à temperatura e umidade em três tipos de solos. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 39, p. 6-12, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/74mMYcBBdFBMVWYSGcgQ7wz/?lang=pt>. Acesso em: 21 mar. 2024.

LEGER, R. J. S. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], v. 98, n. 3, p. 271-276, jul. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18430436/>. Acesso em: 21 mar. 2024.

LEGER, R. J. S.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, [s. l.], v. 120, n. 1, p. 119-124, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1398117/>. Acesso em: 21 mar. 2024.

LIAO, X. *et al.* The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, [s. l.], v. 98, n. 16, p. 7089-7096, 2014. Disponível em: <https://doi:10.1007/s00253-014-5788-2>. Acesso em: 21 mar. 2024.

LIMA, E. L. O. *et al.* Produção semissólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre propágulos desses entomopatógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, [s. l.], v. 77, n. 4, p. 651-659, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/Zky5FWTdTjJ3bVY5DgZnQvC/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 21 mar. 2024.

LOBO JUNIOR, M.; MACEDO, R.; GOULART, P. F. S. **Solos supressivos a doenças**. Brasília: Embrapa, 2022. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1143316>. Acesso em: 21 mar. 2024.

LOPES, I. **Produção de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em diferentes condições de cultivo e em biorreator de bandeja**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2016.

LOPES, M. J. D. S. *et al.* Biotecnologia microbiana: inoculação, mecanismos de ação e benefícios às plantas. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 10, n. 12, 2021. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/354856457_Biotecnologia_microbiana_inoculacao_mecanismos_de_acao_e_beneficios_as_plantas. Acesso em: 21 mar. 2024.

LOPES, R. B. *et al.* *Metarhizium alvesii* sp. nov.: A new member of the *Metarhizium anisopliae* species complex. **Journal of invertebrate pathology**, [s. l.], v. 151, p. 165-168, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29224975/>. Acesso em: 21 mar. 2024.

LOPES, S. R. **Estratégia de transferência de tecnologia para promover o controle biológico de insetos pragas em áreas agrícolas**. Dissertação (Doutorado em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.

LOPES, S. R.; PAIXÃO, M. A. S. da; CRUZ, I. Viabilidade econômica de biofábrica de *Trichogramma pretiosum* para uso contra pragas agrícolas da ordem *Lepidoptera*. **Revista iPecege**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 44-50, 2018. Disponível em: <https://www.revista.ipecege.com/Revista/article/view/135>. Acesso em: 21 mar. 2024.

MARIA, A. *et al.* Sideróforos: uma resposta dos microrganismos. **Química Nova**, [s. l.], v. 25, p. 1155-1164, 2002. Disponível em: https://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=5393. Acesso em: 21 mar. 2024.

MASCARIN, G. M.; PAULI, G. Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos. In: VENZON, Madelaine; PAULA JÚNIOR, Trazilbo José de; PALLINI, Angelo (org.). **Controle Alternativo de Pragas e Doenças na Agricultura Orgânica**. 1. ed. v. 4. Viçosa: Epamig, 2010. p. 169-195.

MEDEIROS, M. A.; VILELA, N. J.; FRANÇA, F. H. Eficiência técnica e econômica do controle biológico da traça-do-tomateiro em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, [s. l.], v. 24, p. 180-184, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/hb/a/J7TZH9qQWstvdYrsywcK8fk/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 21 mar. 2024.

MELO JÚNIOR, J. A. G. D. **A inoculação com microrganismos afeta positivamente a arquitetura do sistema radicular e o acúmulo de nutrientes em mudas de *Euterpe oleracea* (Mart.)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2020.

MENDES, I. D. C.; REIS JUNIOR, F. B. D. **Microrganismos e Disponibilidade de Fósforo (P) nos Solos: uma análise crítica**. Planaltina, 2003. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/568171/1/doc85.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2024.

MONNERAT, Rose. [et al.]. **Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020.

OLIVEIRA, A. S.; RANGEL, D. E. N. Transient anoxia during *Metarhizium robertsii* growth increases conidial virulence to *Tenebrio molitor*. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], v. 153, p. 130-133, 2018. Disponível em: <https://doi:10.1016/j.jip.2018.03.007>. Acesso em: 21 mar. 2024.

OLIVEIRA, D. G. P. **Proposta de um protocolo para avaliação da viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos e determinação da proteção ao calor conferida a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pela formulação em óleo emulsionável**. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010. Disponível em: <https://doi:10.11606/d.11.2010.tde-23022010-082337>. Acesso em: 26 jan. 2024.

OLIVEIRA, J. A. de; CASELLI, F. D. T. R.; PINHEIRO, H. D. Potencial Estratégico do Feijão-

Caupi como Ingrediente para Alimentos Plant-Based. **Cadernos de Prospecção**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 1943-1955, 2023. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/nit/article/view/52936>. Acesso em: 21 mar. 2024.

PARRA, J. R. P. *et al.* Controle biológico: terminologia. In: PARRA, J. R. P. *et al.* (ed.). **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002.

PATREZE, C. M. **Fixação de nitrogênio e micorrização em leguminosas de mata ciliar**. 2003. vii, 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2003. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/87886>. Acesso em: 21 mar. 2024.

PAVA-RIPOLL, M. *et al.* The rhizosphere-competent entomopathogen *Metarhizium anisopliae* expresses a specific subset of genes in plant root exudates. **Microbiology**, [s. l.], v. 157, p. 47-55, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20947574/>. Acesso em: 21 mar. 2024.

PEREIRA, S. R.; EIRA, A. F. Metodologia para produção de *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) Sorokin em cultivo submerso: esporulação da biomassa, efeito da concentração de açúcar e custo do inoculant. **Ciência rural**, [s. l.], v. 29, p. 389-394, 1999. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/ZjkWMD9mbpt6BwRGRHjpd6D/abstract/?lang=pt>.

PRIMAVERSI, A. **Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais**. São Paulo: Nobel, 1999.

QUINTELA, E. D. **Metodologia e custo de produção de *Metarhizium anisopliae* em quirera de arroz**. Brasília: Embrapa, 1994.

RESENDE, M. B. *et al.* Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo**, v. 15, p. 173-242, 2007.

SANTOS, T. T. D.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 199-212, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0367.2011v32n2p199>. Acesso em: 21 mar. 2024.

SASAN, R. K.; BIDOCHKA, M. J. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (*Clavicipitaceae*) is also an endophyte that stimulates plant root development. **American journal of botany**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 101-107, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22174335/>. Acesso em: 21 mar. 2024.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, [s. l.], v. 56, n. 7, p. 1267-1274, 2010. Disponível em: <https://doi:10.1016/j.toxicon.2010.03.008>. Acesso em: 21 mar. 2024.

SILVA, A. C. R. **Infecção via endofítica de *brevicoryne brassicae* (aphididae) com fungos entomopatogênicos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) – Universidade São João del Rei, São João del Rei, 2021.

SILVA, J. C. *et al.* Influência de organismos fixadores de nitrogênio sob fungos micorrízicos arbusculares em rizosfera de *crotalaria juncea*. In: CONGRESSO INTERDISCIPLINAR, 5., 2017, Goianésia. **Anais...** Goianésia: Unievangelica, 2017. Disponível em: <https://anais.unievangelica.edu.br/index.php/cifaeg/article/view/821>. Acesso em: 21 mar. 2024.

SILVA, K. J. D. *et al.* Socioeconomia. In: BASTOS, E. A. (org.). **A Cultura do Feijão-caupi no Brasil**. Brasília: Embrapa Meio-Norte, 2016. p. 6-12. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1065493/a-cultura-do-feijao-caupi-no-brasil>. Acesso em: 21 mar. 2024.

SIQUEIRA, A. C. O. *et al.* Multi-Trait Biochemical Features of *Metarhizium* Species and Their Activities That Stimulate the Growth of Tomato Plants. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, [s. l.], v. 4, 2020.

SREE, S. K.; PADMAJA, V.; MURTHY, Y. L. Insecticidal activity of destruxin, a mycotoxin from *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales), against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larval stages. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 119-125, 2008. Disponível em: <https://doi:10.1002/ps.1480>. Acesso em: 21 mar. 2024.

OTTATTI-DE-LIMA, E. L. *et al.* Produção semissólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre propágulos desses entomopatógenos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 77, n. 4, p. 651-659, 2010. TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TORRES, A. C. *et al.* **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. Livro técnico (INFOTECA-E). Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/769141/glossario-de-biotecnologia-vegetal>. Acesso em: 21 mar. 2024.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transactions of the British Mycological Society**, [s. l.], v. 66, n. 3, p. 407-411, 1976. Disponível em: [https://doi:10.1016/s0007-1536\(76\)80209-4](https://doi:10.1016/s0007-1536(76)80209-4). Acesso em: 21 mar. 2024.

VEGA, F. E. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. **Mycologia**, [s. l.], v. 110, n. 1, p. 4-30, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29863999/>. Acesso em: 21 mar. 2024.

VIDAL, M. C.; SALDANHA, R.; VERÍSSIMO, M. A. A. Bioinsumos: o programa nacional e a sua relação com a produção sustentável. In: GINDRI, Diego Medeiros; MOREIRA, Patrícia Almeida Barroso; VERÍSSIMO, Mario Alvaro Aloisio. **Sanidade vegetal: uma estratégia global para eliminar a fome, reduzir a pobreza, proteger o meio ambiente e estimular o desenvolvimento econômico sustentável**. Florianópolis: CIDASC, 2020. p. 382-409. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/221482/1/Livro-Sanidade-VegetalCap-Vidal.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2024.

- VIEIRA, A. C. P. *et al.* Legislação de biossegurança no Brasil. *In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO*, 25., Cuiabá, 2004. **Anais...** Cuiabá: Empaer, 2004.
- WANG, C.; LEGER, R. J. S. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. **Eukaryotic cell**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 808-816, 2007. Disponível em: <https://doi:10.1128/ec.00409-06>. Acesso em: 21 mar. 2024.
- WAQUIL, J. M. *et al.* Manejo Integrado de pragas: revisão histórica e perspectivas. *In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO*, 24., Sete Lagoas, 2002. **Anais...** Sete Lagoas: ABMS: Embrapa Milho e Sorgo, 2002.
- WILCKEN, C. F. *et al.* Controle biológico do psilídeo-de-concha (*Glycaspis Brimblecombei*) (Hemiptera: *Psyllidae*) em florestas de eucalipto. *In: CONGRESO VIRTUAL IBEROAMERICANO SOBRE GESTIÓN DE CALIDAD EN LABORATORIOS*, 3., Madrid, 2005. **Anais...** Madrid: Valladolid Iberolab, 2005. p. 303-307.
- WOCHNER, Denise. **Análise de custo-benefício do controle biológico de pragas na cultura da soja**. Dourados, MS: UFGD, 2020.
- WYREBEK, M.; BIDOCHKA M. J. Variability in the insect and plant adhesins, Mad1 and Mad2, within the fungal genus *Metarhizium* suggest plant adaptation as an evolutionary force. **PLoS One.**, [s. l.], 2013. Disponível em: <https://doi:10.1371/journal.pone.0059357>. Acesso em: 21 mar. 2024.
- WYREBEK, M. *et al.* Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. **Microbiology**, [s. l.], v. 157, n. 10, p. 2904-2911, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21778205/>. Acesso em: 21 mar. 2024.
- XIAOHAN J. *et al.* *Metarhizium robertsii* as a promising microbial agent for rice in situ cadmium reduction and plant growth promotion. **Chemosphere**, [s. l.], v. 305, oct. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135427>. Acesso em: 21 mar. 2024.
- ZHANG, C.; XIA, Y. Identification of genes differentially expressed in vivo by *Metarhizium anisopliae* in the hemolymph of *Locusta migratoria* using suppression-subtractive hybridization. **Current genetics**, [s. l.], v. 55, p. 399-407, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19506875/>. Acesso em: 21 mar. 2024.
- ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, [s. l.], v. 17, n. 9, oct. 2007. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583150701593963>. Acesso em: 21 mar. 2024.