

COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE LÚPULO *Humulus lupulus* PELO
FUNGO *Beauveria bassiana* (ASCOMYCOTA: HYPOCREALES) E
POSSÍVEIS EFEITOS NA LAGARTA-DO-CARTUCHO *Spodoptera*
frugiperda (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

LETÍCIA MOAMAD DE SALES ABREU

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO – 2024

COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE LÚPULO *Humulus lupulus* PELO
FUNGO *Beauveria bassiana* (ASCOMYCOTA: HYPOCREALES) E
POSSÍVEIS EFEITOS NA LAGARTA-DO-CARTUCHO *Spodoptera*
frugiperda (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

LETÍCIA MOAMAD DE SALES ABREU

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Dr. Gerson Adriano Silva

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO – 2024

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

A162 Abreu, Letícia Moamad de Sales.

COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE LÚPULO *Humulus lupulus* PELO FUNGO *Beauveria bassiana* (ASCOMYCOTA : HYPOCREALES) E POSSÍVEIS EFEITOS NA LAGARTA-DO-CARTUCHO *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA : NOCTUIDAE) / Letícia Moamad de Sales Abreu. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

61 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2024.
Orientador: Gerson Adriano Silva.

1. Lúpulo. 2. Endofitismo. 3. Lagarta-do-cartucho. 4. Manejo Integrado de Pragas. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE LÚPULO *Humulus lupulus* PELO FUNGO *Beauveria bassiana* (ASCOMYCOTA: HYPOCREALES) E POSSÍVEIS EFEITOS NA LAGARTA-DO-CARTUCHO *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

LETÍCIA MOAMAD DE SALES ABREU

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Aprovada em 19 de agosto de 2024.

Comissão Examinadora:

Dra. Elenir Aparecida Queiroz (Pós-doutoranda, Entomologia) – UFV

Dra. Aline Teixeira Carolino (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

Prof. Richard Ian Samuels (Ph.D., Patologia de Insetos) – UENF

Prof. Gerson Adriano Silva (D.Sc, Fitotecnia) – UENF – Orientador

*Tudo que tenho e o que sou
dedico ao meu avô Paulo
Maurício que confiou nas minhas
escolhas e apoiou todas as
minhas decisões.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, especialmente, ao meu avô, Paulo Maurício, que nunca duvidou ou questionou as minhas decisões, apenas apoiou. Sou eternamente grata por tudo que você fez e faz por mim. Tudo que sou e aonde cheguei teve dedo seu. Obrigada!

À minha mãe, Camilla, agradeço por sempre me incentivar nos estudos e me ensinar que a ética é fundamental na jornada da vida.

À melhor 'vódrasta' da vida – Lourdinha – que sempre tem palavras e colo aconchegantes. Você foi essencial nessa caminhada, obrigada!

Ao professor Gerson Adriano, gratidão pela paciência, compreensão, ensinamentos e conversas durante o período que tive o prazer de ser sua orientada. De fato, tenho muita admiração pela pessoa e profissional que você é. São poucas as pessoas que possuem um orientador presente e companheiro, e nisso tive muita sorte. Parabéns pelo exemplo de profissional, você é uma inspiração para os seus alunos;

À Renata pelos infinitos conselhos, pelos conhecimentos repassados e pela amizade. Obrigada por ser uma pós-doc presente e empenhada em disseminar alegria e tudo que sabe;

Agradeço aos professores da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, especialmente prof. Richard, profa. Daniela e prof. Silvaldo, pelos ensinamentos e conversas e ao órgão de fomento CNPq por conceder a bolsa;

Aos meus amigos de laboratório – Ludimila, Wanderson, João, Mayara, Guilherme, Gabriel, Arthur e Kíssila – só tenho a agradecer por tornarem o ambiente de trabalho mais leve, mais engraçado e bem mais sociável. Obrigada pela ajuda e pelas risadas. Vocês me deixaram mal acostumada e fizeram esse período muito feliz!

Agradeço à Larissa, uma pessoa incrível que entrou na minha vida e que tenho o prazer de dividir tantos momentos;

Aos meus colegas de UENF, Raymyson, Willians, Aline, Patrícia e Thaís que me ajudaram durante este trabalho e juntos demos boas risadas;

Ao NEPROV, onde encontrei novos colegas e mais desafios, sou grata.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1	A cultura do <i>Humulus lupulus</i>	5
2.2	Mercado do lúpulo e da cerveja	7
2.3	Problemas fitossanitários na cultura do lúpulo.....	9
2.4	A praga <i>Spodoptera frugiperda</i>	10
2.5	Métodos de controle de <i>Spodoptera frugiperda</i>	12
2.6	Fungos endofíticos.....	13
2.7	Fungo endofítico e entomopatogênico: <i>Beauveria bassiana</i>	15
2.8	Métodos de inoculação endofítica do fungo <i>Beauveria bassiana</i>	17
3	OBJETIVOS.....	18
3.1	Objetivo geral.....	18
3.2	Objetivos específicos.....	18
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1	Obtenção do fungo e produção de conídios.....	19
4.2	Obtenção dos insetos.....	20
4.3	Obtenção de mudas de lúpulo.....	20
4.4	Inoculação de plantas de lúpulo com o fungo <i>Beauveria bassiana</i>	21
4.5	Persistência de colonização de <i>Beauveria bassiana</i> em plantas de lúpulo.....	22
4.6	Características agronômicas.....	23
4.7	Bioensaio de mortalidade de <i>Spodoptera frugiperda</i>	24

4.8	Análises estatísticas.....	25
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1	Colonização endofítica de plantas de lúpulo por <i>Beauveria bassiana</i>	26
5.2	Efeito da colonização endofítica no desenvolvimento das plantas de lúpulo.....	30
5.3	Mortalidade larval e eclosão de pupas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	33
6	CONCLUSÃO.....	35
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

RESUMO

ABREU, Letícia Moamad de Sales Abreu; M.Sc; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; outubro de 2024; COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE LÚPULO *Humulus lupulus* PELO FUNGO *Beauveria bassiana* (ASCOMYCOTA: HYPOCREALES) E POSSÍVEIS EFEITOS NA LAGARTA-DO-CARTUCHO *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE); Orientador: Gerson Adriano Silva.

As soluções para os problemas fitossanitários do lúpulo (*Humulus lupulus*) são insuficientes para reduzir as perdas por pragas. O fungo *Beauveria bassiana* tem sido utilizado em pulverizações para controle de pragas e o seu uso na forma endofítica é considerado promissor para tal ação. Este trabalho objetivou analisar se *B. bassiana* coloniza de forma endofítica plantas de *H. lupulus* e se, quando colonizado, apresenta interação negativa sobre *Spodoptera frugiperda* e se melhora as características agrônômicas das plantas. Mudanças de lúpulo, variedade Cascade, de 50 dias de idade foram transplantadas para vasos de 1,5 litros com solo solarizado. Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com dois tratamentos, um controle e 25 repetições. O isolado de *B. bassiana* LPP139 foi utilizado na concentração 1×10^8 conídios/mL. As inoculações foram realizadas 30 dias após transplante e os métodos de inoculações nas plantas foram pulverização foliar e *soil drenching*. Na pulverização, 2 mL da suspensão foram aplicadas com aerógrafo e as plantas foram envoltas com sacola plástica e após 24 horas foram retiradas. No *soil drenching*, 100 mL da

suspensão fúngica foi vertida nos solos. Para confirmar a colonização, as folhas foram extraídas e maceradas com 1 mL de Tween®20. Os sobrenadantes foram homogeneizados, colocados em placa de Petri com meio PCA e mantidos sob condições de 27°C e fotoperíodo de 12h/12h luz/escuro. As avaliações para confirmar a presença do fungo foram realizadas aos 15, 30, 60 e 90 dias pós-inoculação do fungo. A avaliação de *S. frugiperda* foi realizada com folhas de plantas colonizadas depois de 30 dias da inoculação. Seis bandejas, cada uma com 16 células, foram divididas entre os tratamentos e o controle. Em cada célula foram adicionadas duas lagartas de segundo instar e duas folhas de lúpulo, (64 lagartas/tratamento). A mortalidade foi avaliada durante sete dias e o peso de pupas foi aferido em balança analítica. A altura, da base da planta até o ápice, foi avaliada aos 15, 30, 60 e 90 dias e a massa seca e o volume das raízes foram avaliados aos 90 dias. Confirmou-se a presença do fungo em 52% das plantas via pulverização e 44% via *drenching* aos 15 dias. Na segunda avaliação, aos 30 dias, confirmou-se *B. bassiana* em 92% das plantas via pulverização e 100% via *drenching*. Aos 60 dias, não houve confirmação do fungo nas plantas pulverizadas e no *soil drenching* houve presença em 44% das plantas. Endofiticamente, *B. bassiana* ocasionou baixa mortalidade de larvas de *S. frugiperda*, 27,75% para pulverização e 13,5% para *drenching*, ambas sem diferença significativa do controle, com mortalidade de 13,75%. As características agrônômicas foram iguais estatisticamente. Conclui-se que *B. bassiana* é capaz de colonizar endofiticamente plantas de lúpulo, que a persistência é maior em plantas inoculadas via *soil drenching* e plantas colonizadas permaneceram suscetíveis ao ataque de *S. frugiperda*.

Palavras-chave: Lúpulo; endofitismo; lagarta-do-cartucho; Manejo Integrado de Pragas.

ABSTRACT

ABREU, Letícia Moamad de Sales; M.Sc.; State University of Northern Fluminense Darcy Ribeiro; october 2024; ENDOPHYTIC COLONIZATION OF HOPS *Humulus lupulus* BY THE FUNGUS *Beauveria bassiana* (ASCOMYCOTA: HYPOCREALES) AND POSSIBLE EFFECTS ON THE FALL ARMYWORM *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE); Advisor: Gerson Adriano Silva.

The current solutions for phytosanitary problems in hops (*Humulus lupulus*) are insufficient to reduce pest-related losses. The fungus *Beauveria bassiana* has been used in foliar sprays for pest control, and its endophytic application is considered a promising approach. This study aimed to analyze whether *B. bassiana* can endophytically colonize *H. lupulus* plants and, if so, whether this colonization negatively affects *Spodoptera frugiperda* and improves the agronomic traits of the plants. Fifty-day-old Cascade hop seedlings were transplanted into 1.5-liter pots containing solarized soil. A completely randomized experimental design was used, consisting of two treatments (fungus inoculated and control) with 25 replicates. *Beauveria bassiana* isolate LPP139 was applied at a concentration of 1×10^8 conidia/mL. Inoculations were performed 30 days after transplanting using two methods: foliar spraying and soil drenching. In the foliar spraying treatment, 2 mL of the fungal suspension was applied using an airbrush, and the plants were covered with a plastic bag for 24 hours before removal of the bags. In the soil drenching treatment, 100

mL of the suspension was poured directly onto the soil. To confirm colonization, leaves were extracted and macerated with 1 mL of Tween®20. The supernatants were homogenized, plated on PCA medium in Petri dishes, and incubated at 27°C with a 12h/12h light/dark photoperiod. Fungal presence was assessed at 15, 30, 60, and 90 days after inoculation. To evaluate *S. frugiperda* survival, leaves from colonized plants were collected 30 days post-inoculation. Six trays, each with 16 wells, were used for the bioassays. The treatments and control were evenly distributed among the wells. Two second-instar larvae and two hop leaves were placed in each well (64 larvae per treatment). Mortality was assessed over seven days, and pupal weight was recorded using an analytical balance. Plant height (from the base to the apex) was measured at 15, 30, 60, and 90 days, while dry mass and root volume were measured at 90 days. The presence of *B. bassiana* was confirmed in 52% of the plants via foliar spraying and 44% via soil drenching at 15 days post-inoculation. At 30 days post-inoculation, colonization was confirmed in 92% of sprayed plants and 100% of soil drenched plants. By 60 days, no fungal presence was detected in sprayed plants, while 44% of drenched plants were positive for the fungus. Endophytic *B. bassiana* caused low mortality in *S. frugiperda* larvae, with 27.75% mortality in the foliar spray treatment and 13.5% in the soil drenching treatment, both statistically similar to the control (13.75%). Agronomic traits showed no significant differences between treatments. It was concluded that *B. bassiana* is capable of endophytically colonizing hop plants, with persistence higher in plants inoculated via soil drenching, and that plants colonized by the fungus remained susceptible to attack by *S. frugiperda*.

Keywords: Hops; endophytism; fall armyworms; Integrated Pest Management.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do lúpulo *Humulus lupulus* Linnaeus, 1753, pertence à família Cannabaceae e é originária do Oriente (Bremer *et al.*, 2003; Korpelainen *et al.*, 2021). O lúpulo é de importância econômica nas indústrias alimentícia, cervejeira e farmacêutica por conta das suas características aromáticas e fitoterápicas (Bocquet *et al.*, 2018; Driskill *et al.*, 2022; Paguet *et al.*, 2022). *Humulus lupulus* é uma cultura recém-introduzida e cultivada no Brasil, e ainda carece de estudos específicos na área de fitossanidade. Dessa forma, é necessário um manejo cuidadoso para evitar perdas na produção.

A lupulina, encontrada nas inflorescências femininas chamadas de cones, é a responsável por proporcionar amargor, aroma, sabor e estabilidade à cerveja (Driskill *et al.*, 2022; Paguet *et al.*, 2022). Para que o lúpulo cresça e desenvolva suas inflorescências, estruturas com maior valor comercial, de maneira adequada é necessário pleno sol, temperatura entre 20 a 30°C, pH do solo entre 6 e 7 e implementação de quebra-ventos para que não haja danos na sua estrutura e principalmente na parte comercializada, os cones. A propagação mais utilizada é a assexuada (macroestaquia) que proporciona uma maior uniformidade no cultivo (Paguet *et al.*, 2022).

O mercado do lúpulo é dominado pelos Estados Unidos e pela Alemanha, detentores de aproximadamente 75% da produção mundial (Raiser, 2011; Beer Learning, 2020). No ano de 2023, quando comparado ao ano anterior, houve crescimento de 40% em relação ao número de produtores de lúpulo e aumento

de 130% da área cultivada no Brasil (Leal *et al.*, 2024). No país observa-se um interesse em produzir lúpulo por conta do crescimento de cervejarias e medicamentos fitoterápicos, e por ser uma cultura relativamente recente torna-se necessário um maior aprofundamento sobre o manejo da cultura (Aquino *et al.*, 2022; Menezes e Fernandez, 2022).

Em países onde o lúpulo é cultivado em larga escala há registros de diversas pragas, como ácaros, insetos das ordens Hemiptera, Coleoptera e Lepidoptera (Aquino *et al.*, 2022; Menezes e Fernandez, 2022; Violento *et al.*, 2022). No entanto, ainda não há registros de inseticidas no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (AGROFIT, 2023) para o controle de pragas na cultura, assim, outros métodos de controle surgem como candidatos para tamponar esta lacuna. É importante salientar que métodos de controle devem ser eficientes, seguros ao meio ambiente e tenham custo de implementação acessível aos agricultores (Aquino *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2022; Violento *et al.*, 2022).

Dentre as lagartas desfolhadoras está a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae), uma praga polífaga, migratória e nativa da América, causadora de danos em culturas ao redor do mundo como algodão, arroz, milho, soja e sorgo (Panizzi *et al.*, 2012; Paredes-Sánchez *et al.*, 2021; Tay *et al.*, 2023; Wyckhuys *et al.*, 2024). Seu desenvolvimento é holometábolo, possuem hábito noturno e o ciclo de vida é de, em média, 30 dias (Panizzi *et al.*, 2012). Os adultos apresentam coloração marrom e as fêmeas ovipositam cerca de 1.500 ovos ao longo do ciclo (Cruz, 1995). As lagartas em instares iniciais raspam o limbo foliar e as mais velhas se alimentam de folhas e brotos novos (Cruz, 1995; Gallo *et al.*, 2002).

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) visa o uso de programas de controle que impeçam que a densidade de uma praga cause dano econômico em uma plantação, a partir de diferentes métodos de controle, que não causem danos ao meio ambiente e sejam adaptados a cada sistema de cultivo (Picanço *et al.*, 2014). Os métodos utilizados para o controle de *S. frugiperda* são o controle químico, controle biológico (vírus, bactérias, predadores, parasitoides e fungos entomopatogênicos), controle comportamental e resistência de plantas (Gallo *et al.*, 2002; Figueiredo *et al.*, 2004; Figueiredo *et al.*, 2018; Paredes-Sánchez *et al.*, 2021). No controle biológico, os fungos entomopatogênicos têm destaque,

pois são virulentos para imaturos e para adultos de um amplo número de espécies de insetos (McGuire e Northfield,2020).

O fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912, pertence ao filo Ascomycota e à ordem Hipocreales (Alexopoulos *et al.*, 1996). Além da capacidade como agente biológico contra insetos e ácaros, *B. bassiana* também tem sido estudada devido sua capacidade de colonizar plantas endofiticamente (Jaber e Enkerli, 2017; Jaber e Ownley, 2018) como algodão, batata, banana, cacau, café, milho e tomate (Vega, 2018; Bamisile *et al.*, 2018). A capacidade de colonizar plantas endofiticamente permite que o fungo esteja protegido de fatores externos, o que pode aumentar as chances de infectar e futuramente matar insetos-praga e promover o crescimento das plantas (Parsa *et al.*, 2013; Jaber e Enkerli, 2017; Jaber e Araj, 2018; Jaber e Ownley, 2018; Russo *et al.*, 2019; Bamisile *et al.*, 2021).

A inoculação do fungo endofítico pode ocorrer de forma natural, ou por meio de métodos artificiais, como *soil drenching*, imersão de raízes e pulverização foliar, o último método sendo o mais utilizado (Agrios, 2005; Parsa *et al.*, 2013). A eficiência dos métodos de inoculação é afetada por fatores, como temperatura, umidade, cepa fúngica e espécie vegetal (Parsa *et al.*, 2013; Bamisile *et al.*, 2018).

O estudo de *B. bassiana* como fungo endofítico em lúpulo, como possível agente de controle biológico de pragas e promotor de crescimento de plantas pode contribuir para o aumento da produtividade no cultivo, além de reduzir gastos no manejo de pragas durante o ciclo da cultura com métodos de controle excessivos e pouco sustentáveis em uma cultura que vem crescendo e se mostrando com grande potencial.

No Brasil, já houve registro do gênero *Spodoptera* spp. alimentando-se de plantas de lúpulo (Júnior *et al.*, 2024). Na casa de vegetação do laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro também foi relatado o aparecimento do gênero, sendo assim por estes motivos a espécie *S. frugiperda* foi escolhida como inseto-modelo para este trabalho.

Como hipótese, o fungo *B. bassiana* coloniza endofiticamente plantas de lúpulo e possui interação negativa sobre *S. frugiperda*, portanto, o objetivo é analisar se o fungo coloniza de forma endofítica plantas de *H. lupulus* e se, quando a planta é colonizada, o fungo apresenta uma interação negativa sobre

Spodoptera frugiperda e se é capaz de melhorar as características agronômicas das plantas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura *Humulus lupulus*

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) pertence à ordem Rosales e à família Cannabaceae. É uma planta originária do sul da China, perene de hábito trepador (Bremer *et al.*, 2003; Aquino *et al.*, 2022) e atualmente encontra-se difundida em regiões temperadas dos hemisférios Norte e Sul (Almaguer *et al.*, 2014; Korpelainen *et al.*, 2021).

O lúpulo possui grande valor econômico na indústria alimentícia, sendo essencial para a indústria cervejeira, devido às suas propriedades aromáticas e conservantes. São os grânulos de lupulina (Figura 1) encontrados em suas inflorescências femininas não fertilizadas, popularmente conhecidos como cones, que fornecem o sabor, amargor, aroma e estabilidade microbiana da cerveja devido às resinas e os óleos essenciais (Driskill *et al.*, 2022; Paguet *et al.*, 2022). Os cones possuem estruturas semelhantes a pétalas estipulares, denominadas brácteas, ao redor de um eixo central (Almaguer *et al.*, 2014).

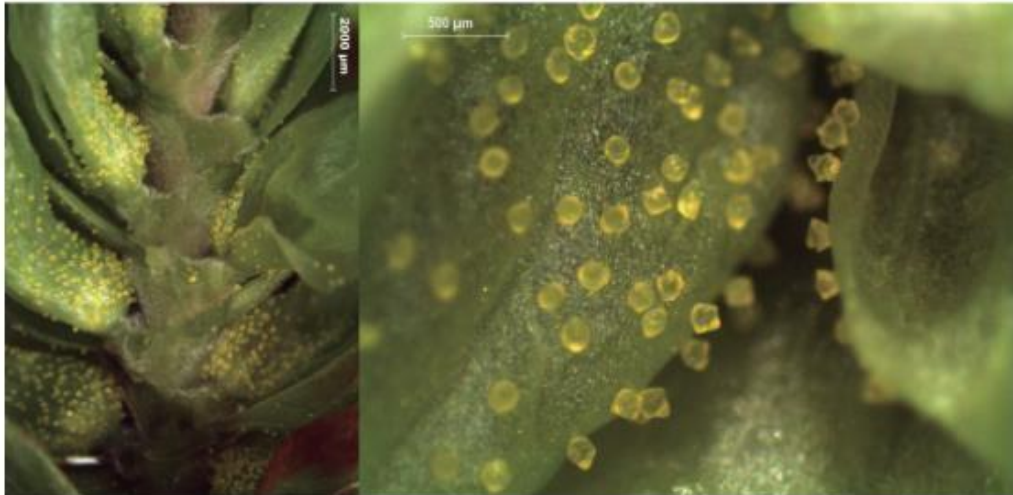


Figura 1. Grânulos de lupulina nas brácteas de inflorescências. Imagem de Spósito *et al.*, 2019.

Na primavera, quando os dias são mais longos e as temperaturas mais altas, os ramos principais são formados a partir dos brotos originários da coroa ou dos rizomas e atingem em média oito metros de altura. Neste ponto se dá o máximo de desenvolvimento e inicia-se a emissão de ramos laterais, onde são emitidas as inflorescências (MAPA, 2022). As raízes do lúpulo podem alcançar 1,5 metros de profundidade, podem se distribuir por um raio 1,5 m lateralmente (Spósito *et al.*, 2019) e nos rizomas pode ocorrer a acumulação de reservas energéticas que serão utilizadas na fase de dormência (MAPA, 2022). Durante o outono, as folhas e ramos começam a senescer e os nutrientes são transferidos para os rizomas (Spósito *et al.*, 2019; MAPA, 2022). Em regiões de clima temperado a planta entra em dormência no outono e inverno (MAPA, 2022).

O lúpulo é uma planta dioica, porém apenas as plantas femininas apresentam cones, estruturas desejadas para cultivo e comercialização (Spósito *et al.*, 2019; MAPA, 2022). Cada inflorescência feminina pode apresentar até 10.000 glândulas de lupulina (Spósito *et al.*, 2019; MAPA, 2022). A lupulina aparenta um aspecto de resina, de coloração amarelada e fica aderida nas brácteas, que estão conectadas a um eixo central (raque) (Rossini *et al.*, 2021).

O lúpulo se desenvolve bem em temperaturas entre 20 a 30°C e precisa de 14 a 16 horas de luz por dia para que possa crescer e florescer (Spósito *et al.*, 2019; MAPA, 2022). A latitude ideal para cultivo é entre 35° e 55°, porém no

Brasil é possível encontrar cultivos de Norte a Sul (MAPA, 2022). Para o cultivo, o pH ideal do solo é de 6 a 7, o solo deve ser leve, profundo, bem drenado e deve haver boa disponibilidade de água. A implementação de quebra-ventos é importante, uma vez que qualquer atrito causado nas brácteas ocasionará em lesões que tornará as inflorescências inviáveis para venda, além dos ventos prejudicarem o tutoramento da planta (MAPA, 2022).

A propagação da cultura pode se dar de forma sexual e assexual. Na forma assexual utiliza-se pedaços do rizoma e parte do entrenó com gemas opostas, o que proporciona uma maior uniformidade no cultivo (Rossini *et al.*, 2021; Paguet *et al.*, 2022). Já na forma sexual utiliza-se sementes resultantes da polinização (natural ou artificial) (Paguet *et al.*, 2022).

2.2 Mercado do lúpulo e da cerveja

Os Estados Unidos e a Alemanha são os detentores das maiores áreas cultivadas de lúpulo, representando aproximadamente 75% a 80% da produção mundial (Raiser, 2011; Almaguer *et al.*, 2014). Em 2019, os Estados Unidos foi o maior produtor com uma produção anual de 49 mil toneladas e a Alemanha produziu 42 mil toneladas (MAPA, 2022). Em 2022, o Brasil importou 4,7 mil toneladas de lúpulo, totalizando um valor de mais de 450 milhões de reais (Aquino *et al.*, 2022; MAPA, 2022).

As plantas de lúpulo, além do uso no mercado cervejeiro, possuem utilização medicinal devido à riqueza de variedades de compostos fenólicos. Possuem efeito relaxante devido os compostos sintetizados pela planta e por isso são recomendadas para fins de ansiedade, depressão, estresse e insônia. Ademais, existem compostos que possuem potencial no tratamento anticâncer, como por exemplo, o Xanthohumol, um flavanoide prenilado. (Kyrou *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2018).

No cenário brasileiro, observa-se um aumento significativo do interesse e da relevância econômica do lúpulo na indústria de cervejas artesanais e o conseqüente crescimento do mercado cervejeiro (Aquino *et al.*, 2022; MAPA, 2022). Do ano de 2022 para 2023 houve um crescimento de 40% do número de produtores de lúpulo no país e um aumento de 130% da área cultivada (hectares) (Leal *et al.*, 2024). Santa Catarina é o estado que possui maior área

cultivada, 34 hectares e o que mais produziu as inflorescências, com um total de 21,8 toneladas, referente às safras 2022/2023. Já o Rio de Janeiro aparece em quarta colocação, com 11,2 hectares cultivados e uma produção de 8 toneladas. A variedade mais cultivada no país atualmente é a Comet (31,6%), seguida por Cascade (24,1%), Saaz (11,1%), Chinook (6,4%) e Zeus (5,2%) (Leal *et al.*, 2024).

Em 2023, a Alemanha tornou-se o principal país exportador mundial de cerveja, comercializando cerca de 1.856.864 litros, o que representa 27,2% do valor total de importações brasileiras de cerveja (Brasil, 2024). Os principais clientes do Brasil são os vizinhos sul-americanos, representando 96,2% do faturamento nacional, sendo o Paraguai o responsável pela compra de maior parte da bebida, 138.682.070 litros, simulando 59,8% do total (Brasil, 2024).

Ao todo existem 1.847 cervejarias registradas no Brasil. A região Sudeste conta com 46,3% das cervejarias registradas no país e o estado de São Paulo é líder neste quesito, o qual apresenta 410 cervejarias, enquanto o Rio de Janeiro ocupa a sexta posição com 129 estabelecimentos. Ambos os estados apresentaram crescimento em relação ao ano de 2022 (Brasil, 2024).

Em 2022 foram registrados 42.831 produtos em cervejarias e em 2023 registraram-se 45.648 produtos, um aumento de 6,6% (Brasil, 2023; Brasil, 2024). As regiões Sul e Sudeste são detentoras da maior concentração de produtos registrados, sendo São Paulo, novamente, o estado com maior número de cervejas registradas (13.654) e o Rio de Janeiro aparece em quinto lugar com 3.732. De todo o volume de cerveja declarado, 14.766.280.095 litros da bebida foram fabricados a partir de inflorescências internacionais, enquanto apenas 41.401.123 litros foram originados de lúpulo nacional (Brasil, 2024).

Dentre as regiões do estado do Rio de Janeiro, a região serrana – Nova Friburgo e Petrópolis – concentra a produção de lúpulo e de cerveja no estado (Brasil, 2024). Há relatos de que a produção no estado iniciou-se no ano de 2016, e desde então se tem observado um aumento na área de produção, onde se destaca o cultivo das variedades Saaz, Cascade, Sorachi Ace, Brewers, Nugget e Cristal (Aquino *et al.*, 2022). O município de Nova Friburgo possui 15 estabelecimentos registrados, atrás apenas do Rio de Janeiro, com 17 unidades (Brasil, 2024). Essa produção é resultado do incentivo dado aos agricultores pelo mercado promissor das cervejas artesanais e pela criação da Lei Estadual

nº 7954/2018 (Rio de Janeiro, 2018), que criou o Polo Cervejeiro Artesanal da Região de Nova Friburgo, e estabelece a festa anual da cerveja artesanal. Esses dados são uma prova do potencial econômico e criativo que a indústria cervejeira artesanal pode oferecer.

Apesar da quantidade de cerveja exportada ter diminuído no período 2021-2022, observou-se aumento na relação valor/peso (US\$/kg) e aumento no número de países que o Brasil exportou cerveja, comprovando a valorização do produto nacional (Brasil, 2023). Por isso, o lúpulo tem ganhado destaque e despertado o interesse de produtores e pesquisadores brasileiros, que buscam soluções para os desafios enfrentados na produção nacional (Aquino *et al.*, 2022). Este crescimento é exemplificado pelos inúmeros cultivos que têm sido registrados em diferentes estados do país, inclusive no Rio de Janeiro (Menezes e Fernandez, 2022).

Apesar do mercado consumidor do lúpulo no Brasil ser bem expressivo, a produção nacional desta cultura ainda é considerada incipiente. São poucas as informações disponíveis sobre a adaptabilidade da planta, assim como de suas variedades e cultivares, às condições ambientais e de solo existentes em nosso país. Portanto, faz-se necessário investir em pesquisas e estudos que possibilitem uma melhor compreensão das necessidades gerais da cultura do lúpulo (Aquino *et al.*, 2022; Menezes e Fernandez, 2022).

2.3 Problemas fitossanitários na cultura do lúpulo

O lúpulo é uma cultura recentemente introduzida e cultivada no Brasil e não existem muitos estudos direcionados à linha de pesquisa de fitossanidade, por isso exige um manejo cuidadoso para prevenir perdas na produção. Ainda não existe produto de controle químico destinado a essa cultura, o que faz do controle biológico uma estratégia interessante, uma vez que é destinado a uma ampla gama de pragas independente da cultura que ela habita (Aquino *et al.*, 2022; AGROFIT, 2023; MAPA, 2022).

Dentre os patógenos registrados nas lavouras mundiais de lúpulo estão os fungos *Erysiphe diffusa*, *Podosphaera macularis*, *Fusarium culmorum*, *Pseudoperonospora humuli* e *Plasmopara viticola* (Silva, 2021; MAPA, 2022). As pragas mais comuns que atacam o lúpulo são ácaros, moscas-branca,

cigarrinhas, cochonilhas, pulgões, formigas cortadeiras, lagartas e besouros desfolhadores (Spósito *et al.*, 2019; Menezes e Fernandez, 2022). Entre essas, o ácaro-rajado (*Tetranychus urticae*) causa perdas significativas à cultura. No entanto, o uso do ácaro predador *Phytoseiulus persimilis* tem sido eficiente para o controle do ácaro rajado (Aquino *et al.*, 2022; Violento *et al.*, 2022).

As lagartas se alimentam do limbo foliar e podem ocasionar desfolhamento generalizado das plantas. Já foram listadas seis famílias da ordem Lepidoptera que prejudicam a produção de plantas de lúpulo: Crambidae, Erebididae, Geometridae, Noctuidae, Nymphalidae e Tortricidae. No estado do Rio de Janeiro foram encontradas lagartas da família Noctuidae se alimentando das folhas (Menezes e Fernandez, 2022).

O cânhamo, *Cannabis sativa* (Rosales: Cannabaceae), cultura da mesma família do lúpulo, apresentou registros, na América do Norte, de lagartas da família Noctuidae, das espécies *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua* e *Trichoplusia ni*, causando desfolhamento e danos nos botões florais (Arey *et al.*, 2022).

Nos Estados Unidos há registro da lagarta *Hypena humuli* (Lepidoptera: Erebididae), conhecida como lagarta-do-lúpulo, caracterizada como praga emergente que preocupa produtores devido seus danos nas folhas e nos cones (Grasswitz e James, 2008). No Brasil há evidências da lagarta *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivo de lúpulo no estado de Santa Catarina, sendo esta uma praga polífaga, presente em todo território nacional e causadora de prejuízos na produção final (Júnior *et al.*, 2024).

Conforme Aquino (2022), é necessário conhecer os problemas fitossanitários que ocorrem na espécie vegetal, uma vez que não há produtos registrados pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (AGROFIT, 2023) e por isso devem-se considerar estratégias ligadas, por exemplo, ao controle biológico (Aquino *et al.*, 2022; Violento *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2022).

2.4 A praga *Spodoptera frugiperda*

O gênero *Spodoptera* inclui em torno de 30 espécies espalhadas em cinco continentes (Montezano *et al.*, 2019). *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) (Figura 2) conhecida popularmente como lagarta-do-

cartucho ou lagarta-militar é um inseto polífago, migratório e altamente adaptável (Silva *et al.*, 1968; Panizzi *et al.*, 2012; Paredes-Sánchez *et al.*, 2021; Abbas *et al.*, 2022). É uma praga nativa do continente americano e na última década foi introduzida na África, Ásia e Oceania, causando danos nas culturas durante todo o ano (Montezano *et al.*, 2019; Tay *et al.*, 2023; Wyckhuys *et al.*, 2024).



Figura 2. Lagarta de *Spodoptera frugiperda* em folha de milho. Retirado de Mais Agro – Syngenta Brasil, 2021.

O ciclo de vida de *S. frugiperda* compreende as fases de ovo, larva, pupa e adulto (Gallo *et al.*, 2002; Panizzi *et al.*, 2012). Os ovos são de coloração amarela e são depositados em “massa” nas folhas das plantas hospedeiras, sendo os ovos encobertos por escamas e cada massa de ovos possui entre 200 a 300 ovos. Cada fêmea pode produzir até 1500 ovos durante a fase adulta. O período de incubação é de 2 a 3 dias a 25°C. As lagartas recém-eclodidas se alimentam da casca do ovo, em seguida passam a se alimentar de folhas e brotos tenros (Cruz, 1995; Gallo *et al.*, 2002). O período larval dura entre 12 e 30 dias, neste período as larvas passam por seis instares, no último instar as larvas medem cerca de 50 milímetros de comprimento (Panizzi *et al.*, 2012). A coloração varia de cinza-escuro a marrom, pode-se observar uma faixa dorsal com pontos pretos e como principal característica um “Y” invertido na cabeça (Cruz, 1995; Gallo *et al.*, 2002). No fim do período larval as lagartas migram para o solo e transformam-se em pupas (tipo obteca) de cor marrom-avermelhada (Cruz, 1995). O período de pupa dura cerca de oito dias. Os adultos possuem uma envergadura de 35 milímetros e são de coloração

amarronzada (Gallo *et al.*, 2002). São de hábito noturno, possuem dimorfismo sexual e a longevidade do adulto é de cerca de 12 dias (Panizzi *et al.*, 2012).

2.5 Métodos de controle de *Spodoptera frugiperda*

O uso de inseticidas é o principal método utilizado para o controle de *S. frugiperda*, no entanto o manejo da lagarta é um desafio para os produtores devido ao desenvolvimento de resistência a inseticidas sintéticos (Abbas *et al.*, 2022; Wyckhuys *et al.*, 2024). Atualmente, já foram constatados populações de *S. frugiperda* resistentes a fosforados, carbamatos, clorofosforados, piretroides e diamidas (Gallo *et al.*, 2002; Paredes-Sánchez *et al.*, 2021).

Em relação ao uso de produtos químicos junto de produtos alternativos, Yoon e Tak (2023) comprovaram a eficácia dos resíduos de lúpulo provenientes das cervejarias como sinergistas a inseticidas para controlar *S. frugiperda*. Houve aumento potencial de químicos convencionais contra *S. frugiperda*, o que promoveu repelência e uma taxa de mortalidade significativa em larvas quando em comparação com o uso de inseticidas sem os resíduos. Esse resultado indica que o lúpulo produz compostos bioativos, terpenoides e flavanoides, que impedem a alimentação do inseto e reduz danos às culturas. O uso desses resíduos como adjuvantes representa uma estratégia sustentável e econômica para o manejo da praga, conseqüentemente há redução do impacto ambiental e retardo o desenvolvimento de resistência do inseto.

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) é um conjunto de medidas para controle de pragas que procura preservar e incrementar os fatores de mortalidade natural, através do uso integrado dos métodos de controle selecionados com base em parâmetros econômicos e ecológicos (Gallo *et al.*, 2002; e Cranston, 2014). No MIP um inseto só é considerado praga quando sua densidade populacional atinge o nível de dano econômico, ou seja, neste momento os danos devido ao seu ataque (prejuízos) são iguais aos custos de seu controle (Gallo *et al.*, 2002; Gullan e Cranston, 2014; Picanço *et al.*, 2014). Os componentes do MIP são a diagnose, a tomada de decisão, as estratégias e os métodos de controle (Picanço *et al.*, 2014). Devido o uso excessivo de inseticidas, torna-se necessário combinar o controle químico com outras práticas de controle (Wyckhuys *et al.*, 2024).

Uma opção de controle de *S. frugiperda* é o uso de agentes microbianos, como os fungos entomopatogênicos, a bactéria *Bacillus thuringiensis* e o vírus *Baculovirus spodoptera* (Valicente e Tuelher, 2009; Valicente, 2015; Abbas *et al.*, 2022; Wyckhuys *et al.*, 2024). Dentre os fungos entomopatogênicos, muitos estudos afirmam que numerosos isolados de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vullemin (Ascomycota: Hypocreales) e *Metarhizium anisopliae* Metschnikoff (Ascomycota: Hypocreales) são encontrados a campo ocasionando mortalidade de larvas (Altaf *et al.*, 2023), inviabilidade de ovos e pupas, e não emergência de adultos de *S. frugiperda* (McGuire e Northfield, 2020; Abbas *et al.*, 2022).

Durante o processo de infecção de um inseto os esporos de *B. bassiana* e *M. anisopliae* germinam, penetram a cutícula e após acessar o interior dos hospedeiros, liberam toxinas que causam a morte (Alves, 1998). Se as condições ambientais forem adequadas pode ocorrer esporulação fora do corpo do hospedeiro, dando continuidade ao ciclo (Isman *et al.*, 2020; Tay *et al.*, 2023).

Dentre as vantagens de adotar-se o controle microbiano estão, a capacidade de multiplicação e dispersão dos esporos no ambiente através dos indivíduos de uma população; os patógenos permanecem na área, solo ou nos cadáveres, possibilitando a transferência de esporos entre gerações; a produção é feita em grande quantidade; e além da mortalidade direta é capaz de diminuir a oviposição, diminuir a viabilidade de ovos e aumentar a sensibilidade da população a outros agentes biológicos e químicos (Alves, 1998; Bamisile *et al.*, 2021; Altaf *et al.*, 2023). Contudo, existem limitações na implementação do controle biológico, como a variabilidade na eficácia dos agentes em diferentes condições ambientais e o desenvolvimento da infecção no inseto pode depender da suscetibilidade do hospedeiro, da população total e da taxa de transferência de esporos entre os infectados e os saudáveis (Bamisile *et al.*, 2021; Wyckhuys *et al.*, 2024).

2.6 Fungos endofíticos

O termo “endofítico” veio de Bary (1884) que se referia a um fungo ou uma bactéria que permanece no interior de tecidos vegetais e não causa sintomas de doenças (Vega, 2018). Os fungos endofíticos são onipresentes e

dominados pelo filo Ascomycota (Vega, 2018). A partir da relação mutualista com o hospedeiro, o fungo é capaz de proporcionar aumento de resistência a patógenos, maior tolerância a condições ambientais adversas, melhorias na absorção de nutrientes e produção de compostos biotivos (Gange *et al.*, 2019) e a planta hospedeira oferece nutrição e proteção para o microrganismo (Devi *et al.*, 2023).

O primeiro relato de fungos endofíticos foi feito por Petrini (1981) onde o autor aborda a presença de *Lecanicillium lecanii* em espécies vegetais da família Araceae. Por sua vez, o primeiro relato de ocorrência natural de *B. bassiana* na forma endofítica foi relatado de Bills e Polishook (1991) em plantas de *Carpinus caroliniana*, conhecidas como pau-ferro, nos Estados Unidos.

Endofíticos são importantes devido à produção de metabólitos secundários, que podem ter ação antiherbívoria (Gange *et al.*, 2019) e alguns são capazes de serem transmitidos verticalmente através das sementes (Quesada-Moraga *et al.*, 2014). A composição das comunidades fúngicas endofíticas pode variar dependendo da espécie de planta hospedeira, da parte da planta colonizada e das condições ambientais. Alguns dos metabólitos produzidos são alcaloides, terpenos, terpenoides, policetídeos, xantonas, isocumarinas, flavonoides, lactonas, fenólicos, esteroides e tetralonas (Devi *et al.*, 2023).

Segundo Gange *et al.* (2019), pode-se constatar que os fungos endofíticos são capazes de afetar significativamente a população de insetos, especialmente de sugadores, e a sobrevivência de larvas, a depender principalmente das ordens de insetos e o grau de especialização dos hospedeiros.

Dentre os fungos endofíticos mais estudados atualmente estão espécies do gênero *Trichoderma*, comumente conhecidos por serem saprofíticos de solo com atividades antifúngicas, porém algumas espécies são capazes de estabelecer associações simbióticas com plantas, o que pode influenciar a tolerância destas a fatores de estresses abióticos e bióticos. Existem registros de isolados que influenciam positivamente as características agrônômicas e que são patogênicos a insetos pela produção de compostos inseticidas, que ativam as defesas das plantas (Harman *et al.*, 2004; Natsiopoulou *et al.*, 2024).

2.7 Fungo endofítico e entomopatogênico: *Beauveria bassiana*

Fungos são microrganismos eucariotos, heterotróficos de forma e tamanho variáveis, com células complexas, parede celular constituída, em sua maioria, de quitina e possuem glicogênio como carboidrato primário (Alexopoulos *et al.*, 1996; Alves, 1998). Existem fungos que se destacam por serem letais a artrópodes: os entomopatogênicos. Estes vêm sendo cada vez mais explorados no Manejo Integrado de Pragas, uma vez que infectam diferentes estágios de desenvolvimento do hospedeiro, matam insetos de diversas ordens, por não poluírem o meio ambiente (Alves, 1998; Gange *et al.*, 2019; Bamisile *et al.*, 2021), e ocorrem naturalmente em diferentes espécies de plantas (Vega, 2018). Esses fungos pertencem a diferentes classes, como Oomycota, Chytridiomycota, Basidiomycota, Entomophthoromycota e Ascomycota, porém os membros das duas últimas classes que realmente se destacam no controle de insetos-pragas (Litwin *et al.*, 2020).

Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin pertence à ordem Hipocreales, ao filo Ascomycota e foi o primeiro fungo a ser estudado com detalhes por Agostino Bassi (Alexopoulos *et al.*, 1996). Sua forma imperfeita é conhecida como *Cordyceps bassiana* (Barnett e Hunter, 1972). É causador da muscardina branca em insetos (Alexopoulos *et al.*, 1996), encontra-se no solo, assim como a maioria dos entomopatógenos (Litwin *et al.*, 2020) e sua patogenicidade pode ser de maneira direta (infecção e produção de toxinas) ou indireta (produção de metabólitos nas plantas) (Gange *et al.*, 2019). Os insetos hospedeiros de *B. bassiana* são os mais diversos, onde se destacam besouros, borboletas, cigarras, formigas, moscas, vespas, entre outros (Alexopoulos *et al.*, 1996), e o fungo foi reisolado de mais de 707 espécies (Bamisile *et al.*, 2021).

A cutícula dos insetos é uma barreira físico-química que os protege contra a perda de água, fornece proteção mecânica e protege contra agentes xenobióticos (Alexopoulos *et al.*, 1996; Alves, 1998). Durante o processo infectivo, os esporos de *B. bassiana* aderem ao tegumento do inseto, germinam no período de 12 a 18 horas, sendo dependente da presença de nutrientes (Alves, 1998). Há a formação de apressórios, na extremidade do tubo germinativo, e em sua parte inferior pode haver uma diferenciação da hifa que facilita o processo de penetração na cutícula (Alves, 1998; Bamisile *et al.*, 2021). A penetração envolve os processos físicos e químicos, onde há o rompimento

das partes membranosas e elaboração de enzimas, respectivamente (Alves, 1998). Após 72 horas da inoculação, o hospedeiro já está colonizado e morre por conta da falta de nutrientes e do acúmulo de substâncias tóxicas (Alves, 1998). Sobre o cadáver é possível encontrar uma massa branca formada por uma grande quantidade de conidióforos e conídios.

As condições ambientais ideais para *B. bassiana* são temperaturas entre 23 e 28°C e umidade relativa em torno de 90% (Alves, 1998), proteção contra radiação UV-B e UV-A, carbono proveniente de exsudados de raízes como fonte de energia e presença de insetos hospedeiros (Chandler, 2017). Quando pulverizados, os esporos ficam sujeitos a condições adversas, e consequentemente podem ficar inviáveis no campo, sem germinar e reduzindo sua eficácia, por conseguinte, não é capaz de infectar os insetos (Jackson *et al.*, 2010). Para sanar este problema, a inoculação visando o endofitismo pode ser um método útil tendendo a redução dos efeitos negativos dos estresses abióticos e da ação de fungicidas (contato) sob o fungo (Vega, 2018).

Além da habilidade de serem eficazes no controle de muitas pragas que causam perdas econômicas em lavouras, *B. bassiana* também tem sido estudado em sua forma endofítica, pela sua capacidade de promover o crescimento das plantas (Jaber e Araj, 2018; Russo *et al.*, 2019; Bamisile *et al.*, 2021), por atuarem como antagonistas de doenças de plantas (Jaber e Salem, 2014; Jaber, 2015) e por colonizarem a rizosfera (Leger, 2008). A abordagem no uso de entomopatógenos como promotores de crescimento pode ampliar a utilização de *B. bassiana* na agricultura e essa interação traz benefícios relacionados a nutrição e proteção oferecidos ao hospedeiro (Parsa *et al.*, 2013; Jaber e Enkerli, 2017; Jaber e Araj, 2018; Jaber e Ownley, 2018; Bamisile *et al.*, 2021).

Estudos utilizando *B. bassiana* como fungo endofítico foram e estão sendo realizados (Vega *et al.*, 2008) em diversas culturas, como algodão (Gurulingappa *et al.*, 2010; Lopez *et al.*, 2014; Lopez e Sword, 2015), banana (Akello *et al.*, 2007), cacau (Posada e Vega, 2005), café (Posada *et al.*, 2007), feijão (Parsa *et al.*, 2013), mandioca (Greenfield *et al.*, 2016), pimenta (Jaber e Araj, 2018; Saragih, 2019), soja, trigo (Sánchez - Rodríguez *et al.*, 2018; Russo *et al.*, 2019), sorgo (Tefera e Vidal, 2009), tomate (Qayyum *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2020) dentre outras.

2.8 Métodos de inoculação endofítica do fungo *Beauveria bassiana*

Dentre os métodos de inoculação já testados para estabelecimento de *B. bassiana* estão injeções no caule, tratamento de sementes, imersões de raízes e rizomas, pulverizações foliares e *soil drenching* (Parsa *et al.*, 2013). Os três últimos métodos são os mais utilizados (Vega, 2018).

A escolha do método de inoculação dependerá de qual parte da planta alvo deseja-se colonizar, da espécie do inseto a ser controlada, levando em consideração seu hábito alimentar, e do objetivo final, seja ele reduzir pragas em uma lavoura, ou para atuar como promotores de crescimento da cultura, ou ambas as alternativas (Bamisile *et al.*, 2018; Bamisile *et al.*, 2021). O percentual de colonização e a mobilidade e a persistência do endófito podem depender da cepa fúngica, espécie e idade da planta, temperatura, umidade relativa do ar e do solo, microrganismos na planta e do solo, tipo de solo e densidade do inóculo (Posada *et al.*, 2007; Tefera e Vidal, 2009; Parsa *et al.*, 2013; Bamisile *et al.*, 2018; Bamisile *et al.*, 2021; Altaf *et al.*, 2023).

A pulverização foliar tem sido o método frequentemente utilizado em trabalhos com fungos entomopatogênicos por apresentarem a capacidade de colonizar os tecidos internos das plantas e ser mais fácil de ser realizada a campo (Posada *et al.*, 2007). Neste método de inoculação, os estômatos são a principal via de entrada dos fungos nas folhas (Agrios, 2005; Bamisile *et al.*, 2018).

Na inoculação via *soil drenching*, as raízes são as vias pelas quais os fungos colonizam as plantas e a aplicação da suspensão fúngica é realizada ao redor da zona radicular (Bamisile *et al.*, 2018). Em pimentão, observaram-se efeitos negativos no desenvolvimento e na taxa de fecundidade de *Myzus persicae*, além de resultados satisfatórios na altura, número de folhas e peso das massas frescas da parte aérea e da raiz após a aplicação de *B. bassiana* e *Metarhizium brunneum* via *soil drenching* (Jaber e Araj, 2018). O método de imersão de raízes mostrou-se eficaz em banana (Akello *et al.*, 2007), tomate (Qayyum *et al.*, 2015) e pinheiro (Brownbridge *et al.*, 2012; Bamisile *et al.*, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Investigar se o fungo *Beauveria bassiana* coloniza de forma endofítica plantas de *Humulus lupulus* L. e, se quando coloniza endofiticamente, o fungo torna plantas de lúpulo resistentes a *Spodoptera frugiperda*.

3.2 Objetivos específicos:

- Verificar se *B. bassiana* coloniza endofiticamente plantas de *H. lupulus* pelos métodos de pulverização foliar e *soil drenching*;
- Verificar a persistência de *B. bassiana* em plantas de *H. lupulus*;
- Verificar se *B. bassiana*, quando coloniza as plantas, apresenta interação negativa sobre larvas de *S. frugiperda*;
- Verificar se, quando colonizadas com o fungo endofítico, as plantas de *H. lupulus* apresentam incremento nas características agronômicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do fungo e produção de conídios

Nesta pesquisa foi utilizado o isolado de *Beauveria bassiana* denominado LPP 139 do acervo do setor de Patologia de Insetos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). O isolado LPP 139 foi obtido pelo isolamento de estruturas fúngicas em cadáver de adulto da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) coletada em lavoura de café no município de Bom Jardim, Rio de Janeiro.

Antes do início dos bioensaios, o isolado foi cultivado em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) e, após a incubação durante duas semanas a $26\pm 1^\circ\text{C}$, os conídios foram recolhidos em ambiente estéril, a partir da raspagem da superfície do meio de cultura com uma espátula de metal, colocados em Tween® 20 (0,02% v/v), homogeneizados e reinoculados em arroz parboilizado. Foram utilizados 50 gramas de arroz, colocado em frasco Erlenmeyer de 500 mL e adicionado 30 mL de água destilada, em seguida tampado com gaze e autoclavado por 20 minutos a 120°C antes da inoculação. Após 10 dias e em ambiente controlado (BOD), a $26\pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h/12h, adicionou-se água destilada com Tween® 20 (0,02% v/v) nos Erlenmeyers para realizar a separação dos conídios de *B. bassiana* do arroz. Por três vezes, as suspensões foram centrifugadas em vórtex e o sobrenadante descartado, a cada ciclo de centrifugação foi adicionado 40 ml de água destilada

conforme a necessidade. Em seguida foi preparada suspensões fúngicas na concentração de 1×10^8 conídios/mL água destilada e para isso foi utilizada a câmara de Neubauer. Tween® 20 (0,02% v/v) foi utilizado como agente tensoativo (Silva *et al.*, 2020).

4.2 Obtenção dos insetos

As lagartas de segundo instar de *S. frugiperda* foram obtidas da criação massal do setor de Manejo Integrado de Pragas da UENF, onde são criadas de acordo com metodologia adaptada de Kasten *et al.* (1978) e alimentadas em dieta artificial à base de feijão, levedo de cerveja e germe-de-trigo.

4.3 Obtenção de mudas de lúpulo

As mudas de *H. lupulus* L. cultivar 'Cascade' foram adquiridas do matrizeiro, com idade média de dois anos, pertencente do setor de Grandes Culturas da UENF. As mudas foram obtidas através de propagação vegetativa realizada com estacas feitas a partir de hastes de plantas de lúpulo (Figura 3). As estacas apresentavam cerca de seis centímetros de altura e um par de folhas, onde retirava-se 50% de área foliar. As estacas foram higienizadas com hipoclorito de sódio 0,5% durante cinco minutos e em seguida enxaguadas com água e foram mantidas em tubetes (260 cm³) com substrato solarizado, processo o qual o solo se mantém durante três dias em um solarizador a pleno sol. As estacas permaneceram nos tubetes até o desenvolvimento do sistema radicular. Quando o sistema radicular estava bem desenvolvido e por todo o tubete, as mudas foram transplantadas para vasos de 1,5 litros, com solo solarizado, e mantidas em casa de vegetação do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia da UENF.

A adubação das plantas foi realizada a cada 30 dias, por três vezes e para tal utilizou-se a solução nutritiva Hoagland e Arnon (1950). A irrigação foi realizada diariamente, duas vezes ao dia. O tutoramento da haste principal e remoção de brotações laterais foram realizados conforme a necessidade. Os testes iniciaram-se quando as plantas tinham por volta de 65 dias de idade.

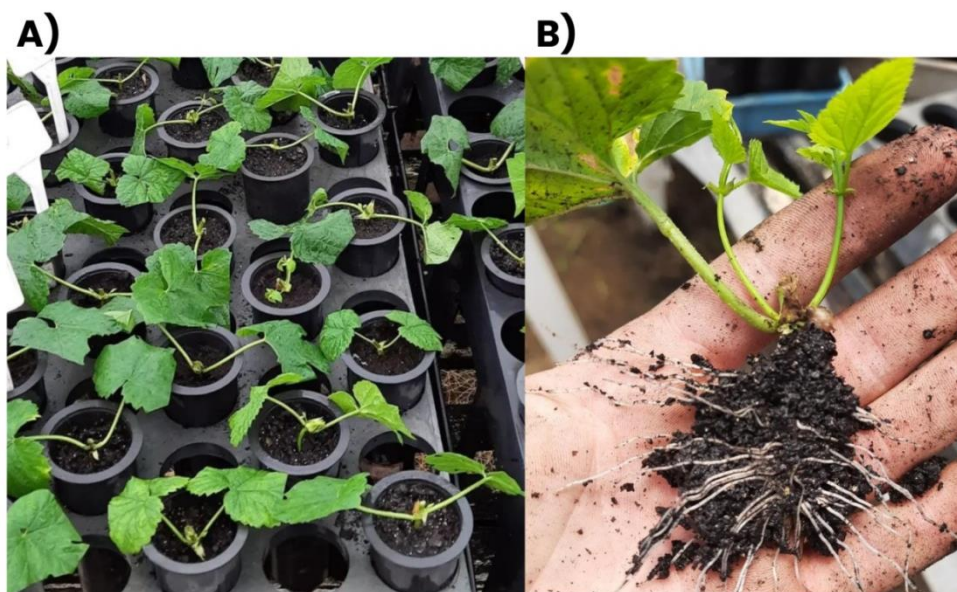


Figura 3. Estacas de lúpulo em desenvolvimento. A) Estacas em tubetes. B) Raízes de mudas bem desenvolvidas – 30 dias. Fotos da autora.

4.4 Inoculação de plantas de lúpulo com o fungo *Beauveria bassiana*

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, iniciado no mês de janeiro até abril. Os tratamentos adotados neste bioensaio foram (1) pulverização foliar; (2) *soil drenching* e; (3) controle (Figura 4). Para cada tratamento foram utilizadas 25 plantas, onde uma foi considerada como uma repetição. A suspensão fúngica foi utilizada na concentração de 1×10^8 conídios/mL de água. As aplicações foram realizadas depois da 16:00 horas, quando a temperatura na casa de vegetação estava por volta de 25°C. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC).

No tratamento de *soil drenching* (Figura 6), as plantas foram mantidas sob estresse hídrico por 48 horas, e após esse tempo, foram aplicados 100 mL de suspensão na superfície do solo (Greenfield *et al.*, 2016). Este volume foi previamente determinado, de forma a evitar percolação da suspensão fúngica pelo vaso. No tratamento de pulverização foliar, cada planta foi pulverizada com dois mililitros da suspensão fúngica com o auxílio de um aerógrafo (TKA12, Trato©). As bases das plantas foram previamente cobertas por papel alumínio para evitar o escoamento da suspensão para o solo (Altaf *et al.* 2023). Após a pulverização, cada planta foi encoberta com saco plástico (5L), com o intuito de gerar um microclima com alto teor de umidade, induzir a abertura de estômatos, e assim potencializar o acesso do fungo ao interior das folhas (Posada *et al.*,

2007). Após 24 horas o saco plástico foi removido (Ramírez-Rodríguez e Sanchez-Penã, 2016). O controle foi composto por plantas de lúpulo sem aplicação de suspensão fúngica, apenas água de irrigação.

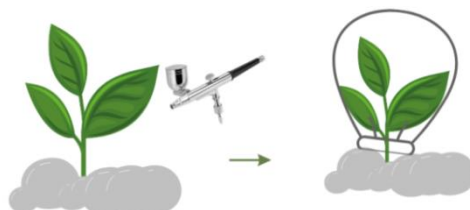
A) soil drenching



100 mL



B) pulverização foliar



2 mL

24 horas



C) controle



Figura 4. Esquema representando os métodos de inoculação utilizados. A) aplicação via *soil drenching*; B) aplicação por pulverização foliar; C) Controle, plantas não inoculadas. Fotos da autora.

4.5 Persistência de colonização de *Beauveria bassiana* em plantas de lúpulo

A avaliação da persistência de *B. bassiana* nas plantas de lúpulo foi baseada e adaptada da metodologia desenvolvida por Silva *et al.* (2020). As avaliações ocorreram aos 15, 30, 60 e 90 dias pós-inoculação (PI). Para tal, folhas de plantas de cada tratamento foram retiradas da haste primária, colocadas em sacola plástica, identificadas e levadas para o laboratório de Patologia de Insetos da UENF. Aos 15 e 30 dias folhas foram retiradas da altura mediana das plantas, já nas outras duas avaliações, de 60 e 90 dias, foram feitas mais de uma retirada, sendo uma da parte mais alta e outra da parte mais baixa das plantas.

No laboratório as folhas foram lavadas em água corrente, seccionadas em pedaços e estes foram colocados em microtubos plásticos, onde se

adicionou água destilada e Tween® 20 (0,02%), e foram maceradas com o auxílio de um bastão metálico, sendo esterelizado em fogo nos intervalos entre as macerações. Os microtubos foram agitados em vórtex e o sobrenadante vertido e espalhado em placa de Petri com meio de cultura seletivo a *B. bassiana* – *Potato Carrot Ágar* (Tabela 1). Após sete dias, em ambiente controlado a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo 12h/12h, realizou-se vistoria das placas e a confirmação da presença ou da ausência de *B. bassiana* nas placas.

Tabela 1. Ingredientes utilizados para o preparo do meio *Potato Carrot Ágar*.

Quantidades	Ingredientes
80 g	Batata
10 g	Cenoura
6,8 g	Ágar
0,2 g	Brometo de cetrimônio
0,05 g	Clorofenicol (antibiótico)
400 ml	Água destilada

4.6 Características agronômicas

A altura das plantas foi medida desde a superfície do solo até o ápice do caule, com o auxílio de uma trena e realizada antes da aplicação de *B. bassiana* e aos 15, 30, 60 e 90 dias PI.

A medição das raízes foi destrutiva e realizada somente aos 90 dias PI. O sistema radicular foi lavado em água corrente. A primeira medida averiguada foi o volume, e para verificá-lo foi necessário um Becker graduado com água. Ao mergulhar toda a raiz, o nível da água era elevado e a diferença registrada. Após esta aferição, as raízes foram secas com papel toalha, colocadas em sacos de papel, identificadas e levadas para uma estufa, onde permaneceu por dois dias sobre temperatura de 60°C . Em seguida, as raízes foram retiradas dos sacos e pesadas em balança analítica.

4.7 Bioensaio de mortalidade de *Spodoptera frugiperda*

As folhas dos tratamentos de pulverização e *soil drenching* foram oferecidas para lagartas de segundo instar de *S. frugiperda*. Para este bioensaio, foram selecionadas plantas que apresentaram confirmação de colonização do fungo e as folhas foram oferecidas aos insetos 30 dias após a aplicação dos tratamentos.

Seis bandejas plásticas com 16 células foram divididas entre os três tratamentos: (1) duas bandejas com plantas colonizadas via pulverização; (2) duas bandejas com plantas colonizadas via *soil drenching*; (3) duas bandejas com plantas do controle (Figura 5). Cada bandeja foi dividida em quatro partes, onde cada parte recebeu folhas de plantas em que foi confirmada a colonização por *B. bassiana*. Antes da utilização das folhas no experimento, estas foram lavadas com água destilada e secas com papel toalha. Em cada célula da bandeja foi adicionada duas folhas de lúpulo e duas lagartas de segundo instar de *S. frugiperda*, ao todo foram utilizadas 32 lagartas/bandeja e 64 lagartas/tratamento.

As bandejas foram acomodadas em BOD, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 60%. A mortalidade das lagartas foi avaliada diariamente por sete dias. Os insetos mortos foram colocados em placas de Petri com papel filtro e dispostas em câmara úmida para avaliação da conidiogênese. O desenvolvimento dos insetos foi observado até o empupamento. O peso de pupas foi aferido por meio de uma balança analítica.

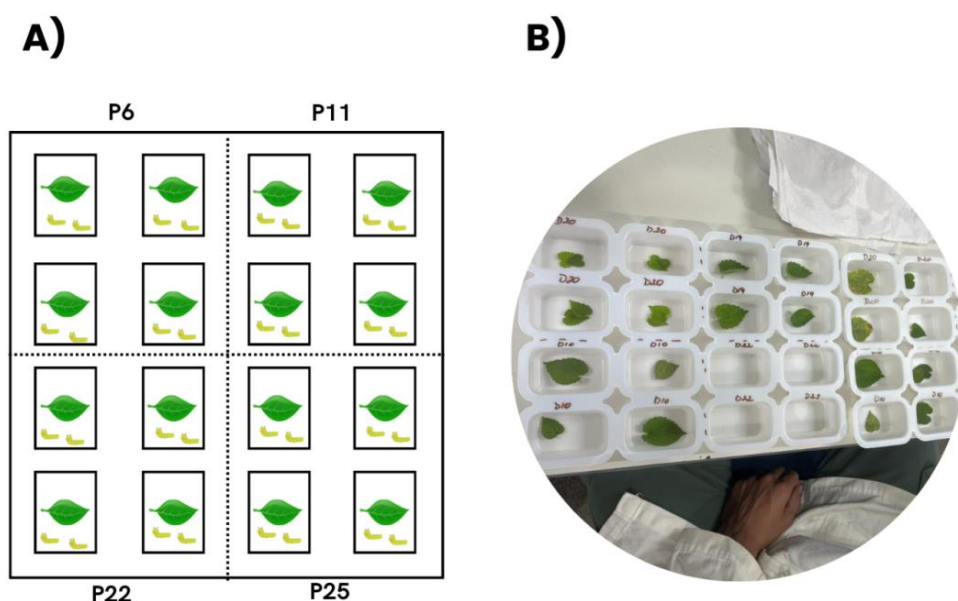


Figura 5. Bioensaio de mortalidade de *Spodoptera frugiperda*. A) Esquema representativo das bandejas. B) Montagem do bioensaio. Esquema e foto da autora.

4.8 Análises Estatísticas

Os dados de colonização de plantas de lúpulo por *B. bassiana* foram submetidos à análise descritiva, onde se calculou o percentual de plantas colonizadas. Os dados de altura de plantas, massa seca, volume de raiz, mortalidade das larvas e peso de pupas de *S. frugiperda* foram submetidas à análise de variância ($p < 0,05$) (One Way Anova) e as respectivas médias foram comparadas com a média do tratamento controle pelo teste Dunnett ($p < 0,05$). A taxa de eclosão das pupas foram transformadas em porcentagem e em seguida comparadas com o controle através do teste Qui-Quadrado (χ^2) ($P < 0,05$). As análises estatísticas e a confecção das figuras foram realizadas com auxílio do software SigmaPlot 12.5 (Systat Software, Inc., Chicago, IL, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Colonização endofítica de plantas de lúpulo por *B. bassiana*

Na primeira avaliação (15 dias) houve confirmação de colonização de *B. bassiana* em 52% das plantas tratadas com pulverização e em 44% das plantas tratadas via *soil drenching*. Na avaliação dos 30 dias PI, houve detecção de *B. bassiana* em 96% das plantas que tiveram suas folhas pulverizadas e em 100% das plantas que receberam a suspensão via *soil drenching*. Aos 60 dias, não houve confirmação de *B. bassiana* nas plantas submetidas à pulverização, mas por sua vez, 44% das plantas tratadas com *soil drenching* apresentaram presença do fungo. Por fim, aos 90 dias não houve confirmação de *B. bassiana* em plantas submetidas à pulverização e nem nas plantas onde houve aplicação via *soil drenching* (Figura 6).

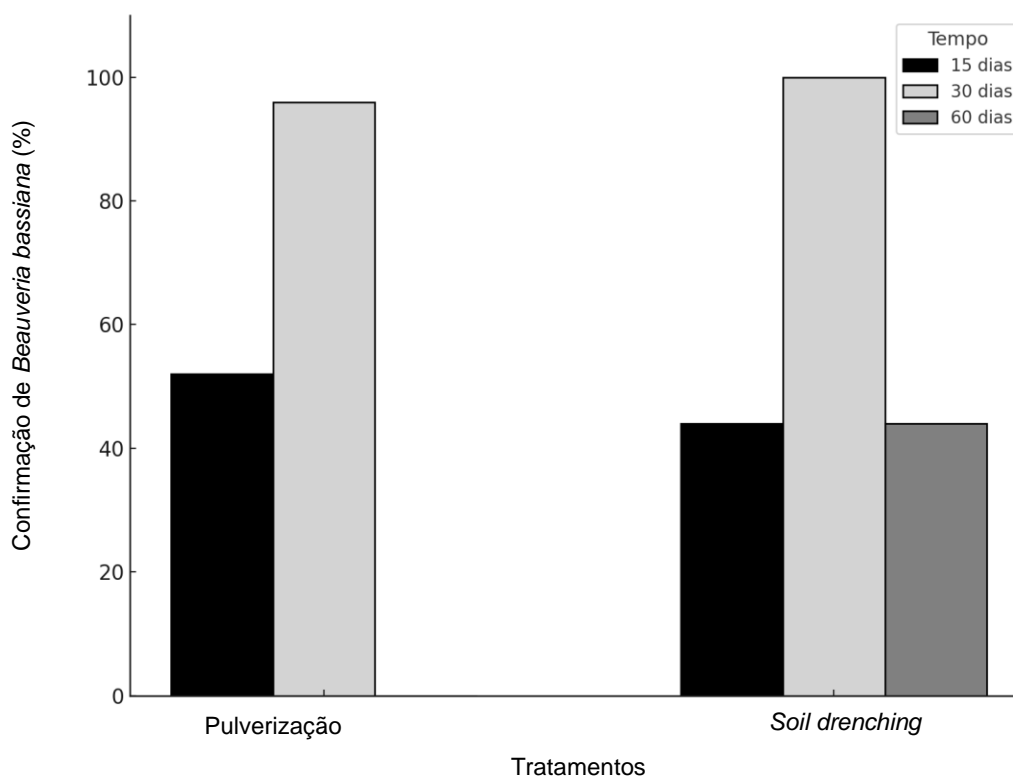


Figura 6. Detecção da presença (%) de *Beauveria bassiana* em plantas de lúpulo aos 15, 30 e 60 PI via *soil drenching* e pulverização.

O fungo *B. bassiana* foi eficaz em colonizar endofiticamente folhas das plantas de lúpulo a partir dos métodos de pulverização e *soil drenching* (Figura 7). A colonização, especialmente aos 15 e 30 dias PI, foi bem-sucedida e este resultado corrobora com as pesquisas já realizadas, onde *B. bassiana* vem sendo relatado como fungo com capacidade endofítica em culturas como algodão, tomate, pimenta, feijão, trigo (Gurulingappa *et al.*, 2010; Parsa *et al.*, 2013; Sánchez - Rodríguez *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2020; Mantzoukas *et al.*, 2022). Esta foi a primeira vez que se constatou a capacidade de *B. bassiana* em colonizar plantas de lúpulo e os resultados demonstram que o endófito apresenta grande capacidade de translocar pelos tecidos das plantas. Pode-se conjecturar que a translocação nos tecidos das plantas tendem a seguir o fluxo em massa (movimento ascendente) que ocorre pelos vasos do xilema, o que pode ser comprovado pela detecção de *B. bassiana* em plantas de lúpulo até 60 dias PI do solo (*soil drenching*) (Posada *et al.*, 2007; Mantzoukas *et al.*, 2022).

O maior percentual de colonização aos 30 dias indica uma melhor adaptação de *B. bassiana* às plantas de lúpulo, provavelmente facilitada pelas

condições microclimáticas durante o experimento. Aos 60 dias, houve uma variação entre os dois métodos, sendo que *soil drenching* apresentou uma colonização mais persistente ao longo do experimento. Meyling e Eilenberg (2007) afirmam que uma persistência por mais tempo em plantas inoculadas via *soil drenching* pode ser atribuída à adaptação do fungo às condições radiculares e ao ambiente rizosférico.

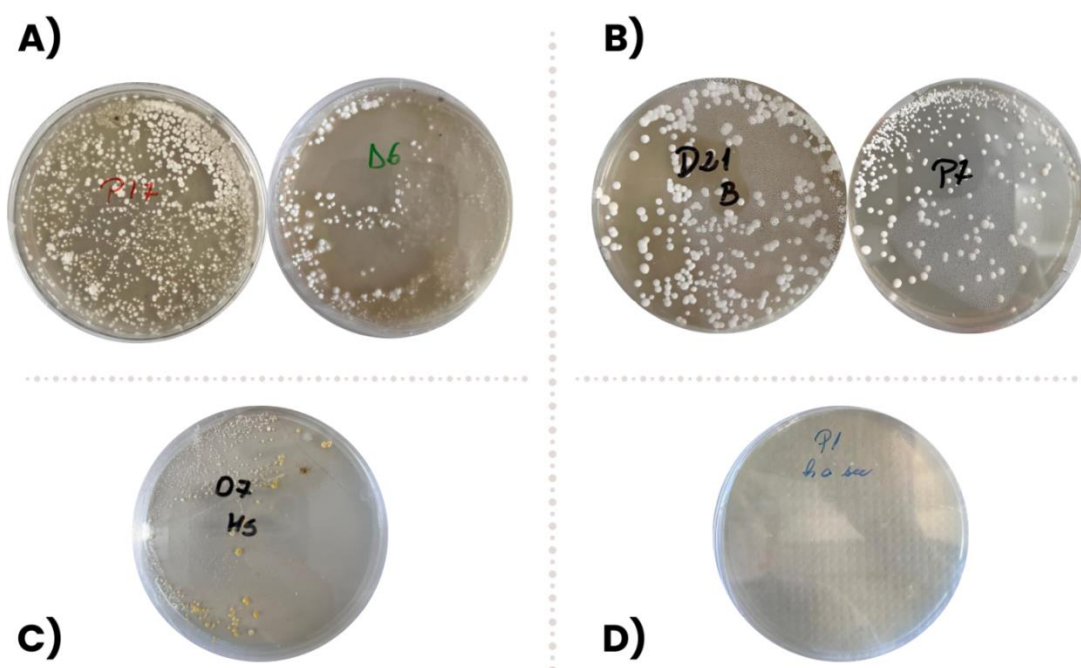


Figura 7. Confirmação de colonização usando meio *Potato Carrot Ágar*. A) Placas com confirmação de *Beauveria bassiana* aos 15 dias – pulverização à esquerda e *soil drenching* à direita; B) Placas com confirmação de *B. bassiana* aos 30 dias – *soil drenching* à esquerda e pulverização à direita; C) Placa com confirmação de *B. bassiana* aos 60 dias - *soil drenching*; D) Placa do grupo controle.

A eficiência da técnica de colonização pode variar entre espécies de plantas, sendo eficiente ou não, possivelmente devido ao genótipo, fator que pode ser determinante na persistência do fungo (Quesada-Moraga, 2006; Vega, 2018). Em pimenta *B. bassiana* teve maior sucesso de colonização quando aplicada através da imersão de sementes, em relação pulverização foliar e *soil drenching* (Saragih, 2019). Em café (Posada *et al.*, 2007) e em cana-de-açúcar (Donga *et al.*, 2018) a técnica de injeção direta foi mais eficiente, enquanto em

tomate os métodos de inoculação pelas raízes e inoculação de mudas foram os melhores (Qayyum *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2020). Autores relatam que algumas plantas possuem poucos estômatos, o que prejudicaria a entrada de fungos na planta através da inoculação foliar, e a presença de compostos cuticulares que podem representar um efeito negativo na germinação dos conídios (Posada *et al.*, 2007; Qayyum *et al.*, 2015). Em contrapartida, foi comprovado que a pulverização é o melhor método de inoculação para sorgo (Tefera e Vidal, 2009), soja e trigo (Russo *et al.*, 2019), milho (Altaf *et al.*, 2023).

Nesta pesquisa, *B. bassiana* aplicada via *soil drenching* em plantas de lúpulo foi reisolada da parte aérea, de forma semelhante, houve sucesso de colonização e reisolamento em tecidos da parte aérea de plantas de mandioca, feijão, sorgo e pimenta com aplicação de *B. bassiana* via *soil drenching* (Tefera e Vidal, 2009; Greenfield *et al.*, 2016; Jaber e Araj, 2018). Estes resultados evidenciam a capacidade de *B. bassiana* de colonizar plantas pelo sistema radicular e de se propagar e translocar internamente nas plantas (Tefera e Vidal, 2009; Parsa *et al.*, 2013).

Trabalhos anteriores relataram que fungos endofíticos podem se propagar nas plantas na forma de hifas (Wagner e Lewis, 2000; Tefera e Vidal, 2009; Sasan e Bidochka, 2012; Landa *et al.*, 2013). Em alguns desses estudos as hifas cresceram nos espaços aéreos entre as células do parênquima e nos vasos do xilema, o que levanta a possibilidade de crescimento sistêmico das hifas das folhas ao caule e através do caule, o que pode resultar na colonização de toda a planta (Wagner e Lewis, 2000).

Aos 90 dias, não houve confirmação da presença de *B. bassiana* em plantas submetidas aos dois métodos de inoculação, o que sugere uma limitação do fungo de se manter como endofítico em plantas de lúpulo por longo tempo. Em videiras, *B. bassiana* conseguiu ser reisolado após 28 dias (Rondot e Reneke, 2018), enquanto em mandioca o reisolamento foi possível depois de sete semanas (Greenfield *et al.*, 2016), e em bananeiras após 120 dias (Akello *et al.*, 2007), assim como em café (Posada *et al.*, 2007). A persistência de fungos entomopatogênicos como endofíticos pode ser limitada pela interação fungo-planta, pelo estresse causado na planta desde sua colonização ou com defesas ativas e competição interna com outros endófitos (Posada *et al.*, 2007; Saikkonen *et al.*, 2010; Gurulingappa *et al.*, 2010; Brownbridge *et al.*, 2012;

Parsa *et al.*, 2013; Greenfield *et al.*, 2016).

Segundo Tefera e Vidal (2009), o sorgo apresentou colonização de *B. bassiana* nos métodos de imersão de sementes, pulverização e *soil drenching*. Os diferentes tipos de solo - estéril, não estéril e vermiculita - influenciaram na colonização do fungo. O método de *soil drenching* combinado com solo estéril apresentou uma maior taxa de colonização do que quando comparado ao solo não estéril (Tefera e Vidal, 2009). Há de se pensar que a interação entre *B. bassiana* e os microrganismos do solo pode prejudicar a colonização do endófito na planta, uma vez que ao utilizar solo solarizado com lúpulo, as taxas de colonização foram melhores no método de *soil drenching* do que no método de pulverização.

5.2 Efeito da colonização endofítica no desenvolvimento das plantas de lúpulo

O fungo *B. bassiana* não afetou o crescimento das plantas de lúpulo. Aos 90 dias PI, as hastes principais das plantas submetidas à pulverização da suspensão fúngica apresentaram comprimento médio de 68,81 cm, as hastes das plantas do tratamento *soil drenching* apresentaram 82,51 cm de comprimento e as hastes do tratamento controle apresentaram 89,38 cm. Estes valores foram estatisticamente iguais ($F_{(gl)} = 0,464$; $p = 0,637$) (Figura 8).

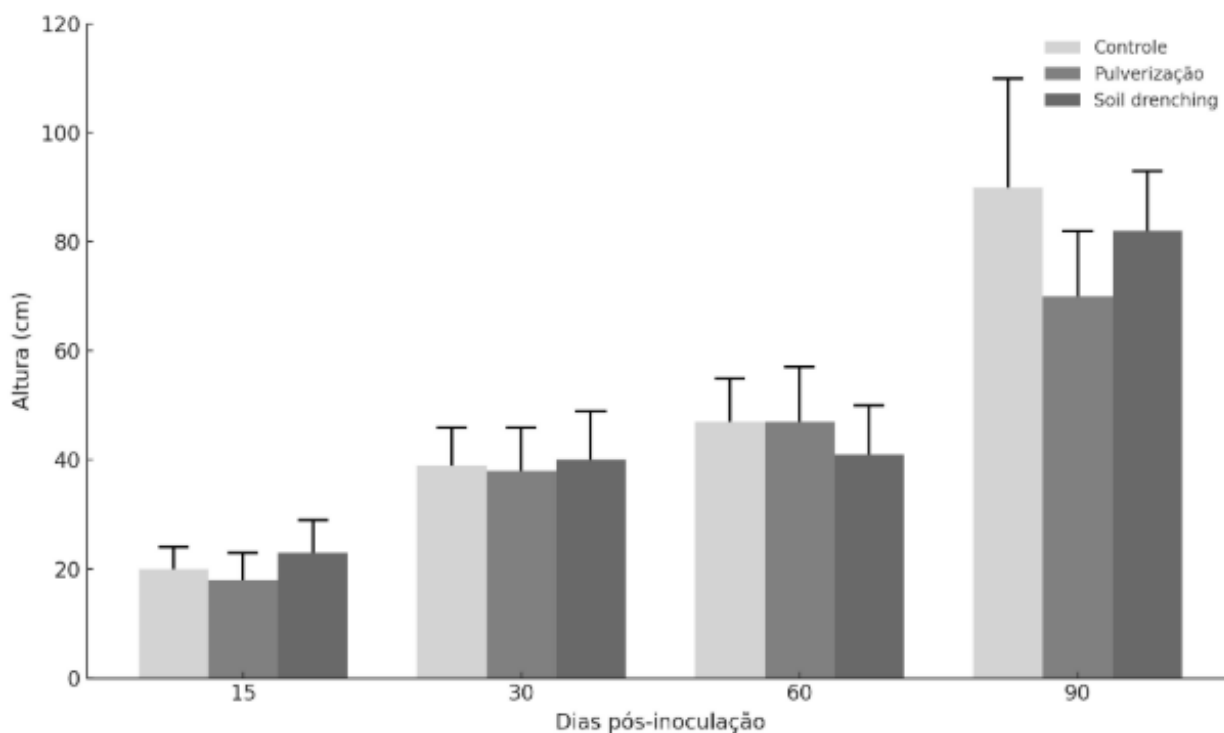


Figura 8. Altura (média \pm erro-padrão) de plantas de lúpulo do grupo controle e dos tratamentos - pulverização e *soil drenching* - aos 15, 30, 60 e 90 dias PI do fungo *Beauveria bassiana*.

O tratamento das plantas com *B. bassiana* não alterou o acúmulo de massa nas raízes de plantas ($F_{(gl)} = 0,676$; $p = 0,527$). A massa seca nas raízes do controle foi de 6,60 g. Já nos tratamentos a massa seca apresentou 6,06 g e 4,85 g, para pulverização e *soil drenching* respectivamente. As plantas do controle apresentaram massa seca 8% e 26% maior que a massa seca das raízes das plantas colonizadas por *B. bassiana* através da pulverização e *soil drenching*.

Assim como a massa seca, o volume das raízes das plantas de lúpulo não foi afetado pela presença de *B. bassiana* na forma endofítica ($F_{(gl)} = 0,243$; $p = 0,788$). O volume nas raízes de *soil drenching* foi de 51,4 cm³. Plantas submetidas à aplicação de *B. bassiana* via pulverização apresentaram volume médio de raiz de 48 cm³ e plantas do controle apresentaram volume médio de raiz de 45,2 cm³.

O fato da inoculação de *B. bassiana*, via *soil drenching* e pulverização foliar, não afetar as características agronômicas das plantas lúpulo é consistente com Silva *et al.* (2020), onde plantas de tomate inoculadas com o mesmo

isolado fúngico deste trabalho – LPP 139 – não apresentaram alteração de crescimento, diâmetro do caule, altura da planta e número de folhas. Gurulingappa e colaboradores (2010) testaram os fungos *B. bassiana*, *Lecanicillium lecanii* e *Aspergillus parasiticus* em plantas de algodão, tomate e trigo e não houve alterações no desenvolvimento e parâmetros fitotécnicos nas plantas inoculadas. Também, Qayyum e coautores (2015) inocularam duas linhagens diferentes de *B. bassiana* em tomateiro e observaram que uma delas promoveu o crescimento das plantas enquanto a outra causou atraso no crescimento e desenvolvimento das plantas e redução no tamanho dos frutos. Como observado por Brownbridge *et al.* (2012) e Parsa e colaboradores (2013), a inoculação de sementes e raízes por fungos entomopatogênicos não afetou a germinação das sementes, o crescimento das plantas e não foram observados danos às raízes.

Jaber e Araj (2018) evidenciaram que *B. bassiana* melhorou o crescimento de pimenta após *soil drenching* em experimento com solo esterelizado, adubado uma vez na semana e conduzido em casa de vegetação. Em outro estudo com feijão-fava, instalado em estufa e com solo não estéril, observou-se que a altura e as massas frescas da parte aérea e das raízes após pulverização também obtiveram resultados satisfatórios (Jaber e Enkerli, 2017). Em pimenta e em couve-flor pode-se observar que as características agrônômicas também aumentaram com a inoculação de fungos entomopatogênicos em experimento instalado também em casa de vegetação com substrato comercial (Razinger *et al.*, 2014; Jaber e Araj, 2018).

Behie e colaboradores (2012) afirmam que fungos entomopatogênicos melhoram a absorção de nutrientes pelo sistema radicular e facilitam a transferência de nitrogênio do inseto para a planta e do solo para a planta, a partir do micélio, servindo como biofertilizantes, favorecendo o crescimento da planta-hospedeira. Estudos mostraram que os endófitos podem realmente estimular o crescimento das plantas (Vega, 2018), mas que, conforme já mencionado, fatores bióticos e abióticos podem afetar o desempenho do desenvolvimento vegetal quando a planta está colonizada por endófitos.

5.3 Mortalidade larval e eclosão de pupas de *Spodoptera frugiperda*

A alimentação de *S. frugiperda* à base de folhas colonizadas 60 dias PI com fungo não resultou em mortalidade das lagartas ($F = 1,326$; $p = 0,313$). A pulverização apresentou taxa de mortalidade de 24,75%, enquanto o controle e *soil drenching* obtiveram percentuais parecidos, sendo 13,75% e 13,50%, respectivamente.

As médias do peso de pupas de *S. frugiperda* oriundas das larvas que consumiram plantas de lúpulo com presença de *B. bassiana* não diferiram do peso de pupas ($F = 2,692$; $p = 0,074$) de larvas que consumiram plantas não inoculadas (controle). O peso médio de pupas no grupo controle foi de 0,213 g, enquanto o peso de pupas de larvas que consumiram plantas inoculadas com *B. bassiana* via pulverização e *soil drenching* foram de 0,235 g e 0,230 g.

A taxa de eclosão das pupas foi maior no controle, atingindo 69%, porém este valor não foi estatisticamente diferente ao percentual de eclosão ocasionada em pupas de larvas que se alimentaram de plantas colonizadas por *B. bassiana* via pulverização (67% de eclosão; $X^2 = 0,060$; $p = 0,807$) e *soil drenching* (66% de eclosão; $X^2 = 0,136$; $p = 0,711$).

Beauveria bassiana testado neste estudo, como endofítico, não afetou a sobrevivência de *S. frugiperda*, apesar de ter sido confirmado a sua presença em folhas de lúpulo até 60 dias PI. Na literatura é listado que fatores como o estágio de desenvolvimento do inseto, a cepa do fungo, o método de inoculação, as características das plantas hospedeiras, o nível de micotoxinas produzidas, as interações sistêmicas plantas-fungos e interações com outros microrganismos podem influenciar a capacidade dos fungos de se manterem como endofíticos e a sua virulência a insetos (Parsa *et al.*, 2013; Vidal e Jaber, 2015; Bamisile *et al.*, 2021). De forma semelhante, *B. bassiana* foi capaz de colonizar plantas de milho e algodão, porém não foi constatado efeito da colonização sobre o consumo foliar e na sobrevivência de larvas de *S. frugiperda* e *Helicoverpa zea* que se alimentaram das plantas (Ramírez-Rodríguez e Sanchez-Penã, 2016; Lopez e Sword, 2015). Já Russo *et al.* (2019), Silva *et al.* (2020), Mantzoukas *et al.* (2022) apontaram efeitos negativos, respectivamente, em plantas de soja, tomate e pimenta colonizados por *B. bassiana* na biologia de *H. zea*, *Phthorimaea absoluta*, *Myzus persicae* e

Tatal absoluta.

Plantas colonizadas exibem efeitos inibidores de consumo ou antibiose sobre as pragas, possivelmente devido à síntese de metabólitos secundários (Vega, 2018). Conforme relatado em estudos anteriores, as plantas colonizadas podem ser prejudiciais aos insetos e afetar indiretamente a aptidão das pragas, a partir de metabólitos, como autodefesa, produzidos pela planta aos ataques. Uma vez bem-sucedida, a infecção por fungos acarreta em uma produção química nova e sistêmica dentro do hospedeiro (Hartley *et al.*, 2015). É preconizado que ocorre alterações na composição de compostos e distribuição de nutrientes em folhas, quando essas são destacadas das plantas (Bamisile *et al.*, 2018, Basimile *et al.*, 2021), fato semelhante pode ter ocorrido neste estudo, já que larvas de *S. frugiperda* foram alimentadas com folhas de lúpulo que foram destacadas das plantas. Falta esclarecer quais formas de propágulos produzidos por fungos endofíticos são responsáveis pela patogenicidade a insetos e são raros os estudos que descrevem a localização exata do fungo no interior do vegetal. O crescimento de entomopatogênicos pode ser intracelular, mas limitado (Ullrich *et al.*, 2017), enquanto o crescimento em feixes vasculares pode ser mais extenso (Wagner e Lewis, 2000). Em trabalhos anteriores houve o reisolamento de fungos endofíticos através de hifas presentes no interior de tecidos de plantas (Wagner e Lewis 2000; Tefera e Vidal, 2009; Sasan e Bidochka, 2012; Landa *et al.*, 2013; Sakulkoo *et al.*, 2018), porém hifas são estruturas que não proporcionam virulência a insetos, e sim os blastosporos (Alkhaibari *et al.*, 2016). A produção de metabólitos tóxicos é um mecanismo utilizado por fungos entomopatogênicos para ocasionar morte de insetos. Beauvericina, bassianolida e destruxina são os principais metabólitos responsáveis pela ação inseticida de *B. bassiana* a insetos, e já foram relatados em plantas colonizadas endofiticamente por *B. bassiana* (Gurulingappa *et al.*, 2010; Wang e Xu, 2012). Outra forma de *B. bassiana* afetar o desempenho de insetos é por meio da indução de defesa nas plantas hospedeiras (Hartley *et al.*, 2015; Bamisile *et al.*, 2018; Bamisile *et al.*, 2021). É necessário entender a comunidade de microrganismos que habitam uma planta para que a interação com *B. bassiana* seja compreendida e a contínua análise das interações múltiplas entre fungos e insetos na colonização endofítica e seu potencial uso no controle biológico (Gange *et al.*, 2019).

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* coloniza endofiticamente plantas de *Humulus lupulus*, pelos métodos de pulverização foliar e *soil* drenching, se mantendo por 60 dias. *Beauveria bassiana* na forma endofítica não alterou os parâmetros agronômicos das plantas de lúpulo e as plantas colonizadas permaneceram suscetíveis a fitofagia por larvas de *Spodoptera frugiperda*.

A utilização dos fungos endofíticos e entomopatogênicos no Manejo Integrado de Pragas exigirá um conhecimento aprofundado e pesquisas futuras são necessárias para compreender o que acontece no interior da planta quando há a interação fungo-planta, quais fatores biológicos influenciam a colonização, qual a influência dos métodos de inoculação perante a colonização, virulência e a persistência do fungo ao longo do tempo, conseqüentemente, as descobertas ajudarão no desenvolvimento de estratégias de manejo mais eficazes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.; ULLAH, F.; HAFEEZ, M.; HAN, X.; DARA, M. Z. N.; GUL, H.; ZHAO, C. R. (2022) Biological control of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Agronomy*, v. 12, n. 11, p. 2704.
- AGRIOS G. N. (2005) Plant Pathology. 5. ed. San Diego: *Elsevier Academic Press*.
- AGROFIT. (2023) Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agrofit.gov.br>. Acesso em 13 de agosto de 2023.
- ALKHAIBARI, A. M.; CAROLINO, A. T.; YAVASOGLU, S. I.; MAFFEIS, T.; MATTOSO, T. C.; BULL, J. C.; SAMUELS, R. I.; BUTT, T. M. (2016) *Metarhizium brunneum* blastospore pathogenesis in *Aedes aegypti* larvae: Attack on several fronts accelerates mortality. *PLoS Pathogens*, v. 12, n. 7, e1005715. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005715>.
- AKELLO, J.; DUBOIS, T.; GOLD, C. S.; COYNE, D.; NAKAVUMA, J.; PAPARU, P. (2007) *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 96, n. 1, p. 34-42.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. (1996) Introductory Mycology. 4 ed. New York: John Wiley and Sons.
- ALMAGUER, C.; SCHÖNBERGER, C.; GASTL, M.; ARENDT, E. K.; BECKER, T. (2014) *Humulus lupulus* – a story that begs to be told. A review. *Journal*

- of the Institute of Brewing*, v. 120, n. 4, p. 289-314.
- ALTAF, N.; ULLAH, M. I.; AFZAL, M.; ARSHAD, M.; ALI, S.; RIZWAN, M.; AL-SHURAUM. L. A.; ALHELAIIFY, S. S.; SAYED, S. (2023) Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in maize plants affects the fitness of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Microorganisms*, v. 11, n. 4, p. 1067.
- ALVES, S. B. (1998) Controle Microbiano de Insetos. 2. ed. rev. e atualizada. v. 4, p. 1163. Piracicaba: FEALQ: ESALQ,
- AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L.; CORDEIRO, P. R. C.; TEIXEIRA, A. J.; SILVA, L. L.; SAMARY, F. T.; OLIVEIRA, S. L. P.; OZASSA, T. Y.; SILVA, M. L. P.; MACHADO, C. R. L.; XAVIER, G. R.; VIOLENTO, G. B. (2022) Rede para o fomento à cultura do lúpulo na região serrana fluminense. In AQUINO, A. M.; TEIXEIRA, A. J.; FONSECA, M. J. O.; ASSIS, R. L.; OZASSA, T. Y. (Eds.). Produção de lúpulo na região serrana fluminense: manual de boas práticas. Nova Friburgo, RJ: Associação Comercial, Industrial e Agrícola de Nova Friburgo – ACIANF. Cap. 1, p. 21-33. ISBN 978-65-992575-1-3.
- AREY, N.C.; LORD, N.P.; DAVIS, J.A. (2022) Evaluation of hemp (*Cannabis sativa*) (Rosales: Cannabaceae) as an alternative host plant for polyphagous noctuid pests. *Journal of Economic Entomology*, v. 115, n. 6, p. 1947-1955.
- BAMISILE, B. S.; DASH, C. K.; AKUTSE, K. S.; KEPPANAN, R.; AFOLABI, O. G.; HUSSAIN, M.; QASIM, M.; WANG, L. (2018) Prospects of endophytic fungal entomopathogens as biocontrol and plant growth promoting agents: An insight on how artificial inoculation methods affect endophytic colonization of host plants. *Microbiological Research*, v. 217, p. 34-50. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.07.004>.
- BAMISILE, B. S.; SIDDIQUI, J. A.; AKUTSE, K. S.; RAMOS AGUILA, L. C.; XU, Y. (2021) General limitations to endophytic entomopathogenic fungi use as plant growth promoters, pests and pathogens biocontrol agents. *Plants*, v. 10, n. 10, 2119.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. (1972) Illustrated genera of imperfect fungi 3. ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 241 p.
- BARY, A. (1884). Vergleichende morphologie und biologie der pilze, mycetozoen und bacterien. Leipzig: Engelmann.

- BEHIE, S.; ZELISKO, P.; BIDOCHKA, M. (2012) Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science*, v. 336, n. 6088, p. 1576-1577. <https://doi.org/10.1126/science.1215933>.
- BEER LEARNING. (2020) Lúpulo: números da produção mundial 2020 e efeitos da COVID-19. Disponível em: <https://beer-learning.com/2020/09/16/lupulo-numeros-da-producao-mundial-2020-e-efeitos-covid-19/>. Acesso em: 8 de novembro de 2024.
- BILLS, G.F.; POLISHOOK, J.D. (1991) Microfungi from *Carpinus caroliniana*. *Canadian Journal of Botany* v. 69, p. 1477–1482.
- BOCQUET, L.; SAHPAZ, S.; HILBERT, J. L.; RAMBAUD, C.; RIVIERE, C. H. L. L. (2018) *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: Overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. *Phytochemistry Reviews*, v. 17, n. 15, p. 1047-1090.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. (2023) Anuário da Cerveja 2023: Ano de referência 2022. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/SDA, 44 p. ISBN 978-85-7991-216-0.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. (2024) Anuário da Cerveja 2024: Ano de referência 2023. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/SDA, 56 p. ISBN 978-85-7991-235-1.
- BREMER, B.; BREMER, K.; CHASE, M. W.; REVEAL, J. L.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; ZMARZTY, S. (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 141, n. 4, p. 399-436. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.t01-1-00158.x>
- BROWNBRIDGE, M.; REAY, S. D.; NELSON, T. L.; GLARE, T. R. (2012) Persistence of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte following inoculation of radiata pine seed and seedlings. *Biological Control*, v. 61, n. 3, p. 194-200. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.01.002>.
- CHANDLER, D. (2017) Basic and applied research on entomopathogenic fungi. In *Microbial control of insect and mite pests*. Academic Press, p. 69-89.
- CRUZ, I. (1995) A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. *Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica* (INFOTECA-E).

- DEVI, R.; VERMA, R.; DHALARIA, R.; KUMAR, A.; KUMAR, D.; PURI, S.; THAKUR, M.; CHAUHAN, S.; CHAUHAN, P. P.; NEPOVIMOVA, E.; KUČA, K. (2023) A systematic review on endophytic fungi and its role in the commercial applications. *Plants*, v. 257, p. 70. <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04087-2>.
- DONGA, T. K.; VEGA, F. E.; KLINGEN, I. (2018) Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as an endophyte in sugarcane, *Saccharum officinarum*. *Fungal Ecology*, v. 35, p. 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.05.004>.
- DRISKILL, M.; JENKINS, J.; PLUMMER, J.; HENNING, J.; SMITH, A.; HENNING, J. A. (2022) Two fingerprinting sets for *Humulus lupulus* based on KASP and microsatellite markers. *PloS One*, v. 17, n. 4, e0257746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257746>.
- FIGUEIREDO, M. L. C. (2004) Interação de inseticidas e controle biológico natural na redução dos danos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho (*Zea mays*) (Tese de doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.
- FIGUEIREDO, M. C. F.; CRUZ, I.; SILVA, R. B. (2018) Eficiência de *Telenomus remus* para o controle de *Spodoptera frugiperda* em milho orgânico. In *Anais do Congresso Brasileiro de Agroecologia*. Campinas, SP, Brasil.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. (2002) Entomologia Agrícola. 10. ed. Piracicaba: Fealq.
- GANGE, A. C.; KORICHEVA, J.; CURRIE, A. F.; JABER, L. R.; VIDAL, S. (2019) Meta-analysis of the role of entomopathogenic and unspecialized fungal endophytes as plant bodyguards. *New Phytologist*, v. 223, n. 4, p. 2002-2010.
- GRASSWITZ, T.R., JAMES, D.G. (2008) Biology, phenology and control of *Hyponomeuta humuli* (Lepidoptera: Noctuidae), an emerging pest of hops (*Humulus lupulus*) (Cannabaceae) in the USA. *International Journal of Pest Management*, v. 54, n. 4, p. 333-338. <https://doi.org/10.1080/09670870802403960>.

- GREENFIELD, M.; GÓMEZ-JIMÉNEZ, M.I.; ORTIZ, V.; VEGA, F.E.; KRAMER, M.; PARSA, S. (2016) *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biological Control*, v. 95, p. 40–48.
- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. (2014) *The insects: An outline of entomology*. 5. ed. Chichester: John Wiley & Sons.
- GURULINGAPPA, P.; SWORD, G. A.; MURDOCH, G.; MCGEE, P. A. (2010) Endophytic *Beauveria bassiana* in corn: Plant growth promotion and activity against *Ostrinia nubilalis*. *BioControl*, v. 55, n. 5, p. 617-624. <https://doi.org/10.1007/s10526-010-9282-2>.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. (2004) *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 1, p. 43-56.
- HARTLEY S. E.; ESCHEN R.; HORWOOD J. M.; GANGE A. C.; HILL E. M. (2015) Infection by a foliar endophyte elicits novel arabidopside-based plant defence reactions in its host, *Cirsium arvense*. *New Phytologist*, v. 205, p. 816-827.
- HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I. (1950) The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, v. 347, Berkeley.
- ISMAN, M. B. (2020) Bioinsecticides based on plant essential oils: A short overview. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 75, n. 7-8, 179-182. <https://doi.org/10.1515/znc-2020-0038>.
- JABER, L. R. (2015) Grapevine leaf tissue colonization by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* s.l. and its effect against downy mildew. *BioControl*, v. 60, n. 1, p. 103-112. <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9634-3>.
- JABER, L. R.; ARAJ, S. E. (2018) 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*, v. 116, p. 53-61.
- JABER, L. R.; OWNLEY, B. H. (2018) Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant

- pathogens? *Biological Control*, v. 116, p. 36-45.
- JABER, L. R.; SALEM, N. M. (2014) Endophytic colonization of squash by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) for managing Zucchini yellow mosaic virus in cucurbits. *Biocontrol Science and Technology*, v. 24, n. 10, p. 1096-1109. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.917694>.
- JABER, L. R.; ENKERLI, J. (2017) Fungal entomopathogens as endophytes: Can they promote plant growth? *Biocontrol Science and Technology*, v. 27, n. 1, p. 28-41. <https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1239133>.
- JACKSON, M. A.; DUNLAP, C. A.; JARONSKI, S. T. (2010) Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl*, v. 55, n. 1, p. 129-145. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9240-7>.
- JIANG, C. H.; SUN, T. L.; XIANG, D. X.; WEI, S. S.; LI, W. Q. (2018) Anticancer activity and mechanism of xanthohumol: a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus* L.). *Frontiers in pharmacology*, v. 9, p. 530.
- JÚNIOR, C. F. S.; SPECHT, A.; GODOY, M. S.; SANTOS, M.; JÚNIOR, C. Z. J.; COSTA, Y. K. S.; PARREIRA, M. C.; FRANCO, C. R. (2024) First record of *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae) in hop (*Humulus lupulus* L.). *Revista Caribeña de Ciencias Sociales*, v. 13, n. 1, p. 557-566.
- KASTEN, P.; PRECETTI, A. A. C.; PARRA, J. R. P. (1978) Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. *Revista de Agricultura*, v. 53, p. 68-78.
- KYROU, I.; CHRISTOU, A.; PANAGIOTAKOS, D.; STEFANAKI, C.; SKENDERI, K.; KATSANA, K.; TSIGOS, C. (2017) Effects of a hops (*Humulus lupulus* L.) dry extract supplement on self-reported depression, anxiety and stress levels in apparently healthy young adults: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover pilot study. *Hormones*, v. 16, n. 2, p. 171-180.
- KORPELAINEN, H.; PIETILÄINEN, M. (2021) Hop (*Humulus lupulus* L.): Traditional and present use, and future potential. *Economic Botany*, v. 75, n. 3-4, p. 302-322. <https://doi.org/10.1007/s12231-021-09518-1>.

- LANDA, B. B.; LOPEZ-DIAZ, C.; JIMENEZ-FERNANDEZ, D.; MONTES-BORREGO, M.; MUNOZ LEDESMA, F. J.; ORTIZ-URQUIZA, A.; QUESADA-MORAGA, E. (2013) In-planta detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new-developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology* v. 114, p. 128–138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2013.06.007>.
- LEAL, D., SATO, A., GONÇALES, F., FORTUNA, G., PARANHOS, M. (2024) Mapa do Lúpulo Brasileiro 2023. Associação Brasileira de Produtores de Lúpulo.
- LEGER, R. J. S. (2008) Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 98, n. 3, p. 271-276. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.010>.
- LITWIN, A.; NOWAK, M.; RÓŻALSKA, S. (2020) Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 19, n. 1, p. 23-42. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09522-3>.
- LOPEZ, D. C.; SWORD, G. A. (2015) The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biological Control*, v. 89, p. 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.03.010>.
- LOPEZ, D. C.; ZHU-SALZMAN, K.; EK-RAMOS, M. J.; SWORD, G. A. (2014) The entomopathogenic fungal endophytes *Purpureocillium lilacinum* (formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Beauveria bassiana* negatively affect cotton aphid reproduction under both greenhouse and field conditions. *PLoS One*, v. 9, n. 8, e103891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103891>.
- MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. (2022) Lúpulo no Brasil: Perspectivas e Realidades. Brasília, DF: MAPA. 175 p. ISBN 978-65-86803-89-1.
- MANTZOUKAS, S.; KITSIOU, F.; NATSIOPOULOS, D.; ELIOPOULOS, P.A. (2022) Entomopathogenic Fungi: Interactions and Applications. *Encyclopedia*, v. 2, p. 646–656.

- MCGUIRE, A. V.; NORTHFIELD, D. T. (2020) Tropical occurrence and agricultural importance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 4, p. 6. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00006>.
- MENEZES, E. L. A.; FERNANDEZ, P. S. C. (2022) Artropodofauna de *Humulus lupulus* L. In AQUINO, A. M.; TEIXEIRA, A. J.; FONSECA, M. J. O.; ASSIS, R. L.; OZASSA, T. Y. (Eds.). Produção de lúpulo na região serrana fluminense: Manual de boas práticas. Nova Friburgo, RJ: Associação Comercial, Industrial e Agrícola de Nova Friburgo – ACIANF. Cap. 8, p. 89-115. ISBN 978-65-992575-1-3.
- MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. (2007) Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, v. 43, n. 2, p. 145-155. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.07.007>.
- MONTEZANO, D. G.; SPECHT, A.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROQUE-SPECHT; V. F. DE PAULA-MORAES; S. V., PETERSON, J. A.; HUNT, T. E. (2019) Developmental parameters of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) immature stages under controlled and standardized conditions. *Journal of Agricultural Science*, v. 11 n. 8, p. 76. <https://doi.org/10.5539/jas.v11n8p76>.
- NATSIPOULOS, D.; TOPALIDOU, E.; MANTZOUKAS, S.; ELIOPOULOS, P. A. (2024) Endophytic *Trichoderma*: Potential and prospects for plant health management. *Pathogens*, v. 13, n. 7, p. 548.
- PAGUET, A. S.; SIAH, A., LEFÈVRE, G.; SAHPAZ, S.; RIVIÈRE, C. (2022) Agronomic, genetic and chemical tools for hop cultivation and breeding. *Phytochemistry Reviews*, v. 21, n. 2, p. 667-708. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09767-4>.
- PANIZZI, A. R.; BUENO, A. D. F.; SILVA, F. D. (2012) Insetos que atacam vagens e grãos. In Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. v. 5, p. 335-420.
- PAREDES-SÁNCHEZ, F. A.; RIVERA, G.; BOCANEGRA-GARCÍA, V.; MARTÍNEZ-PADRÓN, H. Y.; BERRONES-MORALES, M.; NIÑO-GARCÍA, N.; HERRERA-MAYORGA, V. (2021) Advances in control strategies

- against *Spodoptera frugiperda*: A review. *Molecules*, v. 26, n. 18, p. 5587. <https://doi.org/10.3390/molecules26185587>.
- PARSA, S.; ORTIZ, V.; VEGA, F. E. (2013) Establishing fungal entomopathogens as endophytes: Towards endophytic biological control. *Journal of Visualized Experiments*, n. 74, e50360. <https://doi.org/10.3791/50360>.
- PETRINI, O. (1981) Endophytische Pilze in Epiphytischen Araceae Bromeliaceae und Orchidiaceae. *Sydowia* v. 34, p. 135–148.
- PICANÇO, M. C.; GALDINO, T. V. S.; SILVA, R. S.; BENEVENUTE, J. S.; BACCI, L.; PEREIRA, R. R.; MOREIRA, M. D. (2014) Manejo integrado de pragas. In ZAMBOLIM, L.; SILVA, A. A.; PICANÇO, M. C. (Eds.), O que engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários. Viçosa: UFV. p. 389-436.
- POSADA, F.; VEGA, F. E. (2005) Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Mycology*, v. 97, n. 6, p. 1195-1200. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832796>.
- POSADA, F.; VEGA, F. E. (2006) Inoculation and colonization of coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycoscience*, v. 47, n. 5, p. 284-289. <https://doi.org/10.1007/s10267-006-0301-3>.
- POSADA, F.; AIME, M. C.; PETERSON, S. W.; REHNER, S. A.; VEGA, F. E. (2007) Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycological Research*, v. 111, n. 6, p. 748-757. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.04.006>.
- QAYYUM, M. A.; WAKIL, W.; ARIF, M. J.; SAHI, S. T.; DUNLAP, C. A. (2015) Infection of *Helicoverpa armigera* by endophytic *Beauveria bassiana* colonizing tomato plants. *Biological Control*, v. 90, p. 200-207. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.06.002>.
- QUESADA-MORAGA, E.; GARRIDO-JURADO, I.; YOUSEF-YOUSEF, M.; GONZÁLEZ-MAS, N. (2022) Multitrophic interactions of entomopathogenic fungi in BioControl. *BioControl*, v. 67, n. 5, p. 457-472.
- QUESADA-MORAGA, E.; LOPEZ-DIAZ, C.; LANDA, B. B. (2014) The hidden habit of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: First

- demonstration of vertical plant transmission. *PLoS ONE*, v. 9, (e89278).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089278>.
- RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, D.; SANCHEZ-PEÑA, S. (2016) Endophytic *Beauveria bassiana* in *Zea mays*: Pathogenicity against larvae of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Southwestern Entomologist*, v. 41, n. 4, p. 875-878. <https://doi.org/10.3958/059.041.0404>.
- RAISER, T. C. (2011) Commercial aspects of hops. Lecture presented at the 1st Hops Academy, Nürnberg, Germany.
- RAZINGER, J.; LUTZ, M.; SCHROERS, H. J.; PALMISANO, M.; WOHLER, C.; UREK, G.; GRUNDER, J. (2014) Direct plantlet inoculation with soil or insect-associated fungi may control cabbage root fly maggots. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 120, p. 59-66.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.05.006>.
- RONDOT, Y.; REINEKE, A. (2018) Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. *Biological Control*, v. 116, p. 82-89.
- ROSSINI, F.; VIRGA, G.; LORETI, P.; IACUZZI, N.; RUGGERI, R.; PROVENZANO, M. E. (2021) Hops (*Humulus lupulus* L.) as a novel multipurpose crop for the Mediterranean region of Europe: Challenges and opportunities of their cultivation. *Agriculture*, v. 11, n. 6, p. 484.
<https://doi.org/10.3390/agriculture11060484>.
- RIO DE JANEIRO (2018) Lei nº 7.954, que cria o Polo Cervejeiro Artesanal da Região de Nova Friburgo e estabelece a festa anual da cerveja artesanal do Estado do Rio de Janeiro e dá outras providências. *Diário Oficial do Rio de Janeiro*, 14 de maio de 2018. Disponível em: <https://gov.rj.br/>. Acesso em: 13 de setembro de 2023.
- RUSSO, M. L.; PELIZZA, S. A.; VIANNA, M. F.; ALLEGRUCCI, N.; CABELLO, M. N.; TOLEDO, A. V.; SCORSETTI, A. C. (2019) Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) Merr. growth and yield. *Journal of King Saud University-Science*, v. 31, n. 4, p. 728-736.
- SAIKKONEN K.; SAARI S.; HELANDER M. (2010) Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? *Fungal Diversity*, v. 41, p. 101–113.
- SAKULKOO, W.; OSÉS-RUIZ, M.; GARCIA, E. O.; SOANES, D. M.; LITTLEJOHN, G. R.; HACKER, C.; VALENT, B.; TALBOT, N. J. (2018) A

single fungal MAP kinase controls plant cell-to-cell invasion by the rice blast fungus. *Science*, v. 359, n. 6382, p. 1399-1403.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A. R.; RAYA-DÍAZ, S.; ZAMARREÑO, Á. M.; GARCÍA-MINA, J. M.; DEL CAMPILLO, M. C.; QUESADA-MORAGA, E. (2018) An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae. *Biological Control*, v. 116, p. 90–102.

SANTOS, R. S.; SILVA, C. H.; TEIXEIRA, A. J. (2022) Manejo e controle fitossanitário da cultura do lúpulo. In AQUINO, A. M.; TEIXEIRA, A. J.; FONSECA, M. J. O.; ASSIS, R. L.; OZASSA, T. Y. (Eds.). Produção de lúpulo na região serrana fluminense: Manual de boas práticas Nova Friburgo, RJ: Associação Comercial, Industrial e Agrícola de Nova Friburgo – ACIANF. Cap. 9, p. 117-126. ISBN 978-65-992575-1-3.

SARAGIH, M. (2019) Endophytic colonization and plant growth promoting effect by entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, to red chili (*Capsicum annum* L.) with different inoculation methods. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, v. 383, p. 012070. IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/383/1/012070>.

SASAN, R.K.; BIDOCHKA, M.J. (2012) The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany*, v. 99, n. 1, p. 101-107. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.1100136>.

SILVA, A. G. A.; GONÇALVES, C. R.; GALVÃO, D. M.; GONÇALVES, A. J. L.; GOMES, J.; SILVA, M. N., SIMONI, L. (1968) Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil: Seus parasitos e predadores, Parte II, Tomo 1. Insetos, hospedeiros e inimigos naturais. Ministério da Agricultura, p. 622.

SILVA, A. C. L.; SILVA, G. A.; ABIB, P. H. N.; CAROLINO, A. T.; SAMUELS, R. I. (2020) Endophytic colonization of tomato plants by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for controlling the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *CABI Agriculture and Bioscience*, v. 1, n. 1, p. 1-9. <https://doi.org/10.1186/s43170-020-00001-3>.

SILVA, T. R. M. (2021) Pesquisadores da Udesc Lages relatam doença inédita

- no cultivo de lúpulo no Brasil. *Universidade do Estado de Santa Catarina*. Disponível em: https://www.udesc.br/noticia/pesquisadores_da_udesc_lages_relutam_do_enca_inedita_no_cultivo_de_lupulo_no_brasil. Acesso em: 01 de setembro 2023.
- SPÓSITO, M. B.; ISMAEL, R. V.; BARBOSA, C. M. A.; TAGLIAFERRO, A. L. (2019) A cultura do lúpulo. Piracicaba: Série Produtor Rural, n. 68, p. 85. ISSN 1414-4530.
- SYNGENTA. (n.d.). Glossário de alvos: Lagarta militar. *Mais Agro*. <https://maisagro.syngenta.com.br/dia-a-dia-do-campo/glossario-de-alvos-lagarta-militar/>. Acesso em agosto de 2024.
- TAY, W. T.; MEAGHER J. R.; R. L., CZEPAK, C.; GROOT, A. T. (2023) *Spodoptera frugiperda*: Ecology, evolution, and management options of an invasive species. *Annual Review of Entomology*, v. 68, p. 299-317. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-042620-061539>.
- TEFERA, T.; VIDAL, S. (2009) Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *BioControl*, v. 54, n. 5, p. 663–669. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9216-7>.
- VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. S. (2009) Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com baculovírus. *Embrapa Milho e Sorgo*. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1344498/2767891/controle-biologico-da-lagarta-do-cartucho-com-baculovirus.pdf/2e536084-d40f-4e6f-8145-b6880c1487a5>. Acesso em: 14 de setembro de 2023.
- VALICENTE, F. H. (2015) Manejo integrado de pragas na cultura do milho. *Embrapa Milho e Sorgo*. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/125260/1/circ-208.pdf>. Acesso em: 14 de setembro de 2023.
- VEGA, F. E.; POSADA, F.; AIME, M. C.; PAVA-RIPOLL, M. (2008) Entomopathogenic fungal endophytes. *Annual Review of Entomology*, v. 46, p. 72-82. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.008>.
- VEGA, F. E. (2018) The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: A review. *Mycology*, v. 110, n. 1, p. 4-30. <https://doi.org/>

10.1080/00275514.2017.1418578.

- VIDAL, S.; JABER, L. (2015) Entomopathogenic fungi as endophytes: Plant endophyte herbivore interactions and prospects for use in biological control. *Current Science*, v. 109, p. 46-54.
- VIOLENTO, G. B.; OZASSA, T. Y.; MOREIRA, A. J. A. (2022) Muda de lúpulo (*Humulus lupulus* L.). In AQUINO, A. M.; TEIXEIRA, A. J.; FONSECA, M. J. O.; ASSIS, R. L.; OZASSA, T. Y. (Eds.). Produção de lúpulo na região serrana fluminense: manual de boas práticas. Nova Friburgo, RJ: Associação Comercial, Industrial e Agrícola de Nova Friburgo – ACIANF. Cap. 3, p. 47-56. ISBN 978-65-992575-1-3.
- ULLRICH, C. I.; KOCH, E.; MATECKI, C.; SCHÄFER, J.; BURKL, T.; RABENSTEIN, F.; KLEESPIES, R. G. (2017) Detection and growth of endophytic entomopathogenic fungi in dicot crop plants. *Journal Für Kulturpflanzen*, v. 69, n. 6, p. 291-302. <https://doi.org/10.5073/JfK.2017.06.02>.
- WAGNER, B. L.; LEWIS, L. C. (2000) Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 8, p. 3468-3473. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3468-3473.2000>.
- WANG, Q.; XU, L. (2012) Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: A short review. *Molecules*, v. 17, n. 2, p. 2367-2377. <https://doi.org/10.3390/molecules17022367>.
- WYCKHUYS, K. A. G.; AKUTSE, K. S.; AMALIN, D. M.; ARAJ, S.; BARRERA, G.; BELTRAN, M. J. B.; BEN FEKIH, I.; CALATAYUD, P. A.; CICERO, L.; COKOLA, M. C.; COLMENAREZ, Y. C.; DESSAUVAGES, K.; DUBOIS, T.; DUROCHER-GRANGER, L.; ESPINEL, C.; FALLET, P.; FERNÁNDEZ-TRIANA, J. L.; FRANCIS, F.; GÓMEZ, J.; WU, K. (2024) Global scientific progress and shortfalls in biological control of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Biological Control*, v. 191, 105460. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2024.105460>.
- YOON, J.; TAK, J. H. (2023) Potential utilization of the brewery's hop wastes as an insecticidal synergist and repellent against *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Pest Science*, v. 96, p. 1441–1454. <https://doi.org/10.1007/s10340-023-01640-6>.