



Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio

Diversidade e patogenicidade de fungos endofíticos em cafeeiro, e sua interação com produtos fitossanitários, visando ao controle do bicho-mineiro, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) (Guérin-Méneville, 1842)

Carolina Benevides Stefanoviclaus Nunes

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Dr. Antonio Batista Filho

São Paulo
2021

Carolina Benevides Stefanoviciaus Nunes

Diversidade e patogenicidade de fungos endofíticos em cafeeiro, e sua interação com produtos fitossanitários, visando ao controle do bicho-mineiro, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) (Guérin-Méneville, 1842)

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Dr. Antonio Batista Filho

São Paulo
2021

Eu **Carolina Benevides Stefanoviciaus Nunes**, autorizo o Instituto Biológico (IBAPTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: _____ Data ____/____/____

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Nunes, Carolina Benevides Stefanoviciaus.

Diversidade e patogencidade de fungos endofíticos em cafeeiro, e sua interação com produtos fitossanitários, visando ao controle do bicho-mineiro, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) (Guérin-Méneville, 1842) / Carolina Benevides Stefanoviciaus Nunes. - São Paulo, 2021.

65 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2021D.CN009

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Antonio Batista Filho.

Versão do título para o inglês: Diversity and pathogenicity of endophytic fungi in coffee, and their interaction with phytosanitary products, aiming to control the miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) (Guérin-Méneville, 1842).

1. *Coffea arabica* 2. Fungos endofíticos 3. Fungos entomopatogênicos 4. Controle biológico I. Nunes, Carolina Benevides Stefanoviciaus II. Batista Filho, Antonio III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2021/009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Carolina Benevides Stefanoviciaus Nunes

Título: Diversidade e patogenicidade de fungos endofíticos em cafeeiro, e sua interação com produtos fitossanitários, visando ao controle do bicho-mineiro, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) (Guérin-Méneville, 1842).

Exame de qualificação apresentado ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao programa de pós-graduação do Instituto Biológico pela valiosa oportunidade e aos professores, por compartilharem seu grande conhecimento.

Aos meus pais, Marco Aurelio e Rosemeire, por todo apoio, incentivo e ajuda ao longo dessa jornada.

Ao meu orientador, Dr. Antônio Batista Filho, e ao Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida, pelo grande aprendizado e auxílio ao longo desse projeto.

Ao colega, com quem tive o prazer de trabalhar durante seu mestrado e que tanto me ajudou com o envio de amostras para realização do meu projeto, Ricardo Augusto de Souza.

Ao meu amigo e também mestrando, Lucas Vitor, pela grande ajuda no processamento das amostras no início do projeto, por todo o companheirismo.

Ao Gustavo Figueiredo, pela grande colaboração com envio de amostras.

As boas pessoas que apareceram no meu caminho e me ajudaram grandemente com envio de amostras, os cafeicultores Rejane Souza Soares, Márcio Alvarenga e Sérgio Diogo Alves, sem vocês a realização deste trabalho não seria possível.

A amiga Julia Luchiari Fioretti e seu pai, pela ajuda com o fornecimento de amostras

A todos do Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico em Campinas, pelas trocas diárias de conhecimento e por todo o auxílio ao longo dos meus anos na instituição, desde a iniciação científica até o mestrado.

Ao laboratório de Biologia Molecular Aplicada do Instituto Biológico de São Paulo, pela ajuda com a identificação molecular das amostras.

RESUMO

NUNES, C. B. S, **Diversidade e patogenicidade de fungos endofíticos em cafeeiro, e sua interação com produtos fitossanitários, visando ao controle do bicho-mineiro, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) (Guérin-Méneville, 1842).** São Paulo- SP, 2021. 65 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2021.

A cafeicultura tem grande importância no cenário econômico brasileiro, sendo o maior produtor e exportador mundial de café. Uma das principais pragas do cafeeiro, é o bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*), responsáveis por prejuízos de até 70% nas culturas. Contudo, sua principal forma de controle, ainda é o uso de agrotóxicos, que ocasionam resistência em pragas, eliminação de organismos benéficos a lavoura e ainda, contaminação do meio ambiente. Para contornar estes problemas, é necessário o aprofundamento de estudos sobre controle biológico de pragas. Os fungos entomopatogênicos, podem se expressar de forma endofítica nas plantas, sem causar qualquer dano ao seu desenvolvimento e ter a capacidade de reduzir a população de pragas abaixo do nível de dano. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de ocorrência de fungos endofíticos isolados de folhas, caules e raízes de cafeeiros orgânicos da região mogiana e paulista e o seu potencial entomopatogênico sobre o bicho-mineiro. Para isso, foram coletadas amostras vegetais de 4 propriedades, divididas em 4 pontos cardeais da planta (norte, sul, leste e oeste). Estes, passaram por um *screening* em larvas de *Galleria mellonella* e de todas as 101 morfoespécies isoladas, 18 apresentaram capacidade entomopatogênica na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios ml^{-1} . A região de Itapira demonstrou maior quantidade de isolados com capacidade patogênica e as amostras provenientes dos pontos cardeais norte e sul, e da região do caule também apresentaram variabilidade superior. Os fungos *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* e *Aspergillus clavatonanicus* causaram mortalidade de 52,34% - 70,86 e respectivamente, em larvas de *L. coffeella*. Tais fungos também foram testados quanto a sua compatibilidade com produtos fitossanitários e capacidade de colonização dos tecidos foliares por meio de pulverização em mudas de café. Os fungos *A. clavatonanicus* e *C. fumosorosea* apresentaram grande capacidade de colonização de tecidos foliares por pulverização e os fungos *B. bassiana* e 13E apresentaram compatibilidade com a maioria dos inseticidas testados. **Palavras-chave:** *Coffea arabica*, fungos endofíticos, fungos entomopatogênicos, controle biológico.

ABSTRACT

NUNES, C. B. S. **Diversity and pathogenicity of endophytic fungi in coffee, and their interaction with phytosanitary products, aiming to control the miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) (Guérin-Méneville, 1842).**

Sao Paulo- SP. 2021. 65 f. Dissertation (Master in sanity, Food and Environmental safety on Agribusiness) - Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2021. Coffee is one of the most important culture in the Brazilian economic scenario, being the world's largest producer and exporter. the coffee leaf miner (CLM), is considered one of the most important coffee pests due to the high damage with losses of 70% in crops. However, pesticides is the most common form of control methods, which cause resistance, elimination of benefic organisms and also environment contamination. To solve these problems, it's necessary a deeper studies on biological pest control. Entomopathogenic fungi can express themselves endophytically in plants, without causing any damage to their development and having the ability to reduce the pest population below the level of damage. The objective of this work was to evaluate the diversity of occurrence of endophytic fungi isolated from leaves, stems and roots of organic coffee crops from Mogiana and São Paulo region and their entomopathogenic potential on the leaf miner. For this, plant samples were collected from 4 properties. Samples were also collected from 4 cardinal points of the plant (north, south, east and west). The isolated fungi were screened in *Galleria mellonella* larvae and of all 101 isolated morphospecies, 18 showed entomopathogenic capacity on *G. mellonella*, at a concentration of 1.0×10^8 conidia ml⁻¹. As for diversity of occurrence, the Itapira region showed the highest variability of isolates with pathogenic capacity and samples from the north and south cardinal points and from steem also showed higher variability. The fungi *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* and *Aspergillus clavatonanicus* were able to cause mortality of 52.34%, -70.86 % in *L. coffeella* larvae. These fungi were also tested for their compatibility with phytosanitary products and their ability to colonize leaf tissues by spraying on coffee seedlings. The fungi *A. clavatonanicus* and *C. fumosorosea* showed capacity for colonization of leaf tissue by spraying and the fungi *B. bassiana* and 13E showed compatibility with most of the insecticides tested.

Keywords:: *Coffea arabica*, Endophytic fongs, Entomopathogenic Fungus, Biologic control.

Lista de Figuras

- Figura 1- Área plantada em hectares dos principais estados produtores de café no Brasil no período de 2001 a 2020 onde 2020 é uma projeção. Fonte: Conab (2019)4
- Figura 2 - Produção total de café (arábica e conilon) no Brasil, ilustrando os anos de bienalidade positiva e negativa. *Dados de 2020 são uma projeção. Fonte: Conab (2019)4
- Figura 3- Ciclo biológico holometabólico de *Leucoptera coffeella*, passando por todos os estágios de desenvolvimento: A- adulto, B- ovo, C- larva e D- pupa. Fonte: (NUNES, 2020) *foto dos ovos: (REVISTA CAFEICULTURA, 2017)7
- Figura 4- A- Corte microscópico transversal de uma folha de café sem a presença do bicho mineiro, B- lesões provocadas por *Leucoptera coffeella*. EAD = epiderme adaxial; EAB = epiderme abaxial; PP = parênquima paliçádico e PL = parênquima lacunoso. Fonte: Ramiro et al., (2004).9
- Figura 5- Folhas de cafeeiro com lesões provocadas pela lagarta do bicho-mineiro do cafeeiro. Fonte: Nunes, 2020.....10
- Figura 6- Localização das quatro propriedades rurais da região do circuito de águas paulista e mogiano, onde foram coletados folhas, caules e raízes para o isolamento de fungos endofíticos. Fonte: (NUNES, 2020)20
- Figura 7- Material (folhas, caules e raízes) coletados de Serra Negra Águas de Lindóia, Socorro e Itapira, para o isolamento de fungos endofíticos no laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas, em novembro de 2020.....21
- Figura 8- Processo de desinfecção de amostras para o isolamento dos fungos endofíticos, descrito por Araújo *et al.* (2002) e adaptado. A-esterilização superficial com água corrente e detergente, B- esterilização profunda com emersão de amostras em álcool 70% por 3 minutos, HCl por 10 minutos, Álcool 70% por um minuto e enxague por duas vezes em água destilada estéril., C- secagem, D- deposito do material em placas de Petri contendo BDA, E- Incubação em BOD por 7 dias a 25°C e F- obtenção dos isolados endofíticos.....22
- Figura 9- Método Castellani utilizado para preservação de fungos endofíticos utilizando frascos de vidro autoclavados, contendo água destilada estéril e vedação com tampa de borracha e plástico filme.....23
- Figura 10- A- Esponja fenólica, B- Esponja fenólica cortada em círculos e utilizada na montagem das gaiolas onde foram depositadas folhas infestadas com bicho-mineiro, C-

incubação das gaiolas em sala climatizada a 25°C com fotófase de 12 horas a 25°C com fotófase de 12 horas.....	25
Figura 11- Teste de potencial entomopatogênico de fungos endofíticos sobre <i>L. coffeella</i> realizado no laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas, em março de 2021 onde: A- lagarta de <i>L. coffeella</i> morta em folha inoculada com o fungo <i>A.fumigatus</i> . B- Transferência do cadáver infectado para câmara úmida encubada em BOD por 7 dias até o surgimento do fungo e C- replicação em placas de Petri contendo meio de cultura BDA.....	26
Figura 12- Morfoespécies (frente e verso) encontradas em tecidos vegetais de cafeeiro da cidade de Itapira -SP, isoladas no laboratório de controle biológico do Instituto Biológico de Campinas- SP, em novembro de 2019. (listados na tabela 3).....	30
Figura 13- Morfoespécies (frente e verso) encontradas em tecidos vegetais de cafeeiro da cidade de Águas de Lindoia -SP, isoladas no laboratório de controle biológico do Instituto Biológico de Campinas- SP, em novembro de 2019. (listados na tabela 4). 7,11 E 15 foram identificadas molecularmente como <i>Bipolaris gossypina</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Beauveria bassiana</i> respectivamente.....	32
Figura 14- Morfoespécies (frente e verso) encontradas em tecidos vegetais de cafeeiro da cidade de Águas de Socorro -SP, isoladas no laboratório de controle biológico do Instituto Biológico de Campinas- SP, em novembro de 2019. (listados na tabela 4)	34
Figura 15- Morfoespécies (frente e verso) encontradas em tecidos vegetais de cafeeiro da cidade de Serra Negra -SP, isoladas no laboratório de controle biológico do Instituto Biológico de Campinas- SP, em novembro de 2019. (listados na tabela 6)	36
Figura 16- Número total de fungos endofíticos isolados por propriedade (Itapira, Serra Negra, Socorro e Águas de Lindoia no estado de São Paulo) em novembro de 2019.....	38
Figura 17- Número total de fungos endofíticos de cafeeiros isolados por posição geográfica (Norte, sul, leste e oeste) de tecidos vegetais de cafeeiros localizados em Águas de Lindoia, Socorro, Serra Negra e Itapira, do estado de São Paulo em novembro de 2019	
Figura 18. Número total de fungos endofíticos de cafeeiros isolados por tecido vegetal (caules, folha e raízes de cafeeiros) das propriedades de Águas de Lindoia, Socorro, Serra Negra e Itapira do estado de São Paulo em outubro de 2019	39
Figura 19- Larvas de <i>Galleria mellonella</i> inoculadas no teste de entomopatogenicidade realizado no laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas, em janeiro de 2020, onde: A- foi infectada com o fungo “8S” e B e C- com o fungo ‘20S’.....	40
Figura 20- Isolados que demonstraram atividade entomopatogênica em screening com <i>G. mellonella</i> , posteriormente utilizados no teste de entomopatogenicidade sobre <i>L. coffeella</i> . 1- <i>Diatrypella vulgaris</i> 2- <i>Aspergillus clavatonanicus</i> , 3- <i>Diaporthe oxe</i> , 4- <i>Bipolaris glossypina</i> , 5- <i>Fusarium oxysporum</i> , 6- <i>Beauveria bassiana</i> , 7- <i>Diaporthe endophytica</i> , 8- <i>Diaporthe endophytica</i> , 9- <i>Beauveria bassiana</i> , 10- <i>Trichoderma asperellum</i> , 11- <i>Diaporthe endophytica</i> ,	

- 14- *Aspergillus fumigatus*, 15- *Beauveria bassiana*, 16- *Nemania difusa* e 17- *Trichoderma asperellum*.....40
- Figura 21- . Gráfico representando a porcentagem de fungos endofíticos entomopatogênicos de cafeeiros para *G. mellonella* das regiões de Itapira, Socorro, Serra Negra e Águas de Lindoia no estado de São Paulo..... 41
- Figura 22- Porcentagem de fungos entomopatogênicos para *G. mellonella* existentes em amostras de caules, folhas e raízes de cafeeiro extraídos das propriedades de Socorro, Águas de Lindoia, Serra Negra e Itapira em São Paulo..... 42
- Figura 23- Gráfico representando a porcentagem de fungos entomopatogênicos para *G. mellonella* existentes em cafeeiros nas posições cardeais (norte,sul, leste e oeste). 42
- Figura 24- Ação de produtos fitossanitários (Bravonil, Amistar, Actara, Emzeb e Comet) sobre o crescimento vegetativo de colônias de fungos endofíticos entomopatogênicos do cafeeiro após sete dias, em relação à testemunha, onde; A- *B. bassiana*, B- Fungo *A. fumigatus*, C- Fungo *A. clavatonanicus* e D- Fungo *Diatrypella Vulgaris*..... 46
- Figura 25- Larvas e pupas de bicho-mineiro colonizadas com fungos entomopatogênicos, onde: A- Lagarta saudável. B- Lagartas mortas com inoculação do isolado 13E (*A. fumigatus*) antes de expressar crescimento micelial no tegumento. C- Lagarta morta com inoculação do isolado 13E colonizando o corpo do inseto. D e E- Lagarta morta com o fungo 5M (*A.clavatonanicus*). F e G- Lagartas colonizadas com o fungo IBCB130 (*C. fumosorosea*). H- Pupas saudáveis de *L.coffeella*. I, J e K- Pupas mortas com a suspensão de IBCB130, apresentando o casulo colonizado por micélio e formação desorganizada. L e M- Pupa e lagarta em processo de pupa colonizadas pelo fungo 5M e N- Comparação de uma pupa saudável com uma lagarta que morreu em meio ao processo de pupagem 49
- Figura 26- Gráfico da mortalidade de fungos endofíticos sobre *L. coffeella* para cada tratamento ao longo de 15 dias de observação realizada no laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas em maio de 2021..... 50
- Figura 27- Isolamento de fungos encontrados em cadáveres de *L. coffeella* isolados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA que posteriormente foram utilizadas para estabelecer os índices de MC (mortalidade confirmada). Onde: A- Isolado correspondente do fungo *A. clavatonanicus* expressado no cadáver do inseto. B- Isolado IBCB130, C- Isolado de *B. bassiana* e D- *A. fumigatus* 52
- Figura 28- Resultados do experimento de inoculação de fungos em mudas de café, antes e depois da inoculação, por aspersão foliar, com suspensão dos endofíticos entomopatogênicos na concentração 1×10^8 conídios ml⁻¹, onde; A-Fungo *A. clavatonanicus* que apresentou capacidade de colonização dos tecidos foliares em 4 das 5 mudas e B- Fungo IBCB130, presente em 5 das 5 mudas testadas, após 7 dias de inoculação.....53
- Figura 29- Resultados do experimento de inoculação de fungos em mudas de café, por aspersão foliar de suspensão fúngica com 1×10^8 conídios -1 onde; C- isolado IBCB425, que apresentou capacidade de colonização dos tecidos foliares em 1 das 5 mudas e D- Isolado 21E (*B. bassiana*), e isolado 13E (*A. fumigatus*) que não mostraram capacidade de colonização em folhas, caules e raízes de mudas de café Após 7 dias da segunda inoculação.54

Lista de Tabelas

Tabela 1- Caracterização de latitude, longitude e altitude dos locais de coleta de folhas de café para isolamento de fungos endofíticos, realizado no laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico em novembro de 2020.....	20
Tabela 2 - Informações dos produtos fitossanitários registrados para a cultura do cafeeiro (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com concentrações recomendadas pelo fabricante, utilizados nos experimentos de interação com produtos fitossanitários, realizado no laboratório de Controle Biológico do Instituto biológico de Campinas- SP, em dezembro de 2020.....	26
Tabela 3 - Tabela de classificação de morfoespécies, utilizando o método de para classificação de fungos endofíticos do cafeeiro isolados de folhas, caules e raízes provenientes da propriedade de Itapira. Foram analisados coloração (frente e verso) da colônia, tipo de textura, topografia e borda descritos nos métodos de Carvalho & Pereira (2016).....	29
Tabela 4 - Fungos endofíticos do cafeeiro isolados de folhas, caules e raízes provenientes da propriedade de Águas de Lindoia. Analisando-se coloração (frente e verso) da colônia, tipo de textura, topografia e borda, descritos nos métodos de Carvalho & Pereira (2016), para identificação de morfoespécies. (2016).....	31
Tabela 5 - Fungos endofíticos do cafeeiro isolados de folhas, caules e raízes provenientes da propriedade de Socorro- SP. Analisando-se coloração (frente e verso) da colônia, tipo de textura, topografia e borda, descritos nos métodos de Carvalho & Pereira (2016), para identificação de morfoespécies (2019).....	33
Tabela 6 - Fungos endofíticos do cafeeiro isolados de folhas, caules e raízes provenientes da propriedade de Serra Negra, São Paulo. Analisando-se coloração (frente e verso) da colônia, tipo de textura, topografia e borda, descritos nos métodos de Carvalho & Pereira (2016), para identificação de morfoespécies.,.....	35
Tabela 7 - Grupos de características predominantes de fungos endofíticos isolados de cafeeiros, criados a partir da observação macroscópica de características dos isolados de folhas de café, descritos nos métodos de Carvalho & Pereira (2016) para identificação de morfoespécies.....	37
Tabela 8 - Número médio de <i>G. Mellonella</i> mortas/repetição e mortalidade total (%) aos 10 dias após a aplicação de suspensão de 1x10 ⁸ conídios ml ⁻¹ , em função dos diferentes tratamentos.....	41
Tabela 9 - Identificação molecular realizada no laboratório de biologia molecular do Instituto Biológico de São Paulo em 2021, de isolados endofíticos entomopatogênicos selecionados no screening com larvas de <i>G. mellonella</i> , posteriormente utilizados em teste de patogenicidade em <i>L. coffeella</i>	43

Tabela 10- Tabela de viabilidade de conídios e diâmetro do crescimento vegetativo e conidiogênese de fungos endofíticos, entomopatogênicos para <i>L. coffeella</i> em interação com produtos fitossanitários, realizado no laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas em 2021. Classificação da toxicidade dos produtos fitossanitários aos isolados de fungos selecionados para controle de <i>Leucoptera coffeella</i>	45
TABELA 11 - Classificação da toxicidade dos produtos fitossanitários aos isolados de fungos selecionados para controle de <i>Leucoptera coffeella</i> , de acordo com o método proposto por Alves et al., 1998).....;	47
Tabela 12 - Mortalidade dos fungos endofíticos (%) por repetição sobre <i>L. coffeella</i> durante 15 dias de observação.....	49
TABELA 13. % de mortalidade total (MT) de lagartas, pupas e adultos de <i>L. coffeella</i> causada por fungos endofíticos do cafeeiro e do banco de dados de fungos entomopatogênicos do Instituto Biológico de Campinas, Oldemar Cardim Abreu, nas concentrações 1x10 ⁸ conídios ml ⁻¹	51
Tabela 14- Porcentagem de mortalidade confirmada (M.C.) em cadáveres de <i>L. coffeella</i> , em função dos isolados testados no URL de controle biológico do Instituto Biológico nas concentrações 1x10 ⁸ conídios ml ⁻¹	53
Tabela 15 - Resultado do teste de potencial de colonização de fungos endofíticos entomopatogênicos em mudas de cafeeiro, inoculados por aspersão foliar e avaliados após 7 e 14 dias de incubação em sala climatizada a 25°C. Realizado in vitro no laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas em junho de 2021.....	55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3.1. Características do café.....	2
3.2. Aspectos econômicos do café.....	3
3.3. Pragas do café e problemas com produtos fitossanitários.....	5
3.4. Bicho-mineiro do cafeeiro.....	5
3.4.1. Fatores de influência.....	5
3.4.2. Morfologia externa.....	6
3.4.3. Ciclo.....	6
3.4.4. Comportamento.....	7
3.4.5. Prejuízos Econômicos.....	9
3.4.7. Métodos de controle e monitoramento.....	11
3.5. Controle biológico.....	12
3.5.1 Os fungos como agentes de controle biológico.....	13
3.5.2. Características gerais e diversidade de fungos entomopatogênicos.....	13
3.5.3. Modo de ação.....	14
3.5.4. Fungos endofíticos.....	15
3.5.4.1 Mecanismos de ação.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Coleta de amostras.....	19
4.2 Isolamento de fungos endofíticos.....	21
4.3 Preservação dos fungos endofíticos.....	22
4.4 Identificação morfológica dos fungos.....	23
4.5 Teste entomopatogênico em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	23
4.6 Teste entomopatogênico em larvas de bicho-mineiro.....	24
4.7 Impactos de produtos químicos no crescimento e conidiogênese de fungos endofíticos	
4.8 Avaliação do potencial de infecção em mudas de café.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1. Isolamento de fungos endofíticos e variabilidade de morfoespécies.....	28
5.2. Variabilidade morfológica dos fungos.....	38
5.3 Teste de entomopatogenicidade em larvas de <i>G. mellonella</i>	39

5.4 Identificação molecular.....	43
5.5 Teste de interação com produtos fitossanitários.....	44
5.6 Teste de entomopatogenicidade em larvas de <i>L. coffeella</i>	47
5.7 Avaliação do potencial de infecção em mudas de café.....	54
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

O café é uma cultura proveniente de regiões intertropicais, onde o clima quente e úmido facilita seu desenvolvimento, o que faz do Brasil o maior produtor e exportador de café do mundo, responsável por 30,13% da produção mundial total. Devido a extensão do território, nosso país possui uma grande diversidade climática e de solos que possibilita a produção de cafés com qualidades diferentes, como aromas e sabores dentro dos gêneros economicamente produzidos.

É responsável por gerar mais de 8 milhões de empregos no país em toda a sua cadeia produtiva, que inclui desde a produção de insumos, até o preparo para consumo, evidenciando também a importância de seu papel social. (MAPA, 2017).

Segundo o senso do CONAB (2019), a projeção da safra total de 2020, pode alcançar de 57,2 milhões e 62,02 milhões de sacas beneficiadas, por ser considerado um ano de bialidade positiva.

Porém, a cafeicultura sofre com os ataques de diversos insetos-praga, dentre as quais, o bicho-mineiro, *Leucoptera coffeella* (Guerin-Meneville & Perrottet, 1842) destaca-se pela severidade do ataque, que gera grandes prejuízos econômicos, podendo atingir até 70% de perda, fazendo com que as mudas demorem, em alguns casos, de 3 há 5 anos para se recuperar.

Os fatores ideais para o desenvolvimento desta praga são temperaturas quentes, baixa umidade relativa e alta incidência solar, fatores que são agravados pelas modificações das formas de cultivo, como a mecanização das lavouras, onde as plantas ficam mais espaçadas para facilitar a passagem do maquinário e conseqüentemente, desestabilizando o microclima mantido pelo adensamento.

A principal forma de controle do bicho-mineiro, é a utilização de inseticidas. Contudo, estes produtos costumam não ser específicos, afetando o meio ambiente e causando um desequilíbrio na população de organismos benéficos e inimigos naturais que antes, controlavam naturalmente a incidência da praga.

Os fungos entomopatogênicos são classificados como inimigos naturais de muitos patógenos de importância agrícola e são encontrados vivendo naturalmente no solo, ou de forma endofítica no tecido de plantas. Estes apresentam alta especificidade, por vezes até a nível de espécie, a muitas pragas e não agredem o meio ambiente e e os inimigos naturais.

Regiões que fazem do agronegócio a base de seu PIB, como é o caso do Brasil,

precisam de mecanismos que mantenham a alta produção e ao mesmo tempo, produza alimentos sem riscos de toxidade para a população e para o meio ambiente. Para alcançar este objetivo, o controle biológico é imprescindível.

2. OBJETIVOS

Geral:

Identificar microrganismos endofíticos e avaliar seu potencial de ação como agentes de controle biológico.

Específicos:

Isolar fungos endofíticos obtidos de folhas de cafeeiro a partir de coleta de amostra vegetal de diferentes regiões orgânicas produtoras de café

Avaliar o potencial entomopatogênico sobre *Leucoptera coffeella* (bichomineiro), de isolados de fungos endofíticos obtidos a partir de folhas, caules e raízes de cafeeiro.

Analisar o índice de variabilidade fúngica, de acordo com a região, orientação geográfica e tecido amostral da planta.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Características do café

O gênero *Coffea* abriga dois subgêneros, *Coffea* e *Baracoffeano* (BRIDSON; 1987), da qual o primeiro abriga 124 espécies descritas (MISTRO, 2012). Dentre estas, as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (conilon ou robusta) são as principais, pelo seu potencial econômico. (SANTOS, 2018).

O cafeeiro arábica, é uma espécie autógama, cultivados originalmente em áreas com altitude acima de 800 m, corresponde a cerca de 75% da produção global exportada. Seus frutos possuem maior valor no mercado e qualidade superior, devido grãos maiores e mais lisos. Demanda mais tratos culturais e custo de produção, por ter maior sensibilidade a doenças e pragas. (REVISTA CAFEICULTURA, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Devem ser cultivados em altitudes mais elevadas em torno de 450 a 800 metros, com clima mais ameno, de 18 a 22°C (SANTOS, 2018)

C. canephora é uma espécie alógama, possuem grãos menores com baixa acidez, mais sólidos solúveis e maior teor de cafeína. É uma planta arbórea de porte menor, mais vigorosa e com maior resistência a doenças e pragas e mais tolerante a variações climáticas. Possui maior

produtividade (OLIVEIRA *et al.*, 2012), naturalmente adaptada a locais de baixa altitude, porém, tem seu desenvolvimento primário mais lento que o cafeeiro arábica (DUPIER, 2017).

A maior produção de café Robusta é no Vietnã, por ser uma espécie e temperaturas elevadas (DUPIER, 2017). Produzem um café de menor qualidade quando comparado as variedades de arábica, configurando um preço menor. Com isso, são amplamente utilizadas nas indústrias de café solúvel (SANTOS, 2018).

O ciclo bienal é característico do cafeeiro e é definido pela alternância de anos em alta e baixa produção, sendo o cafeeiro arábica o mais afetado por esse processo. Esse processo é causado pela competição que ocorre internamente na planta por água e nutrientes, durante um período em que as fases reprodutiva e vegetativa encontram-se, simultaneamente. Dessa forma, em períodos de alto crescimento vegetativo, há baixa produção de frutos. (SAKIYAMA, 2015).

O café é uma cultura proveniente de regiões intertropicais, onde o clima quente e úmido facilita seu desenvolvimento, o que faz do Brasil o maior produtor mundial.

3.2 Aspectos econômicos do café

É a segunda maior commodity e a segunda bebida mais consumida no mundo, com cultivo em mais de 80 países e movimentando cerca de 85 bilhões de dólares, sendo que no Brasil movimenta anualmente cerca de 19 bilhões de dólares (MISTRO, 2012).

O Brasil é o maior produtor e exportador de café, responsável por 30,13% da produção total em grão, seguido do Vietnã (19,18%), da Colômbia (9,41%) e da Indonésia (7,67%) (MAPA, 2015). Dentre os maiores países importadores, destacam-se os mercados da União Europeia, EUA, Japão e Rússia (ICO, 2019).

No Brasil, os maiores produtores são os estados de: Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Rondônia, Paraná e Goiás, responsáveis por cerca de 98,65% da produção nacional. (MAPA, 2016). A produção de café arábica está concentrada em Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Bahia. Já o café conilon é cultivado principalmente no Espírito Santo, Bahia e Rondônia (MAPA, 2019).

Gráfico 3 – Área das Unidades da Federação

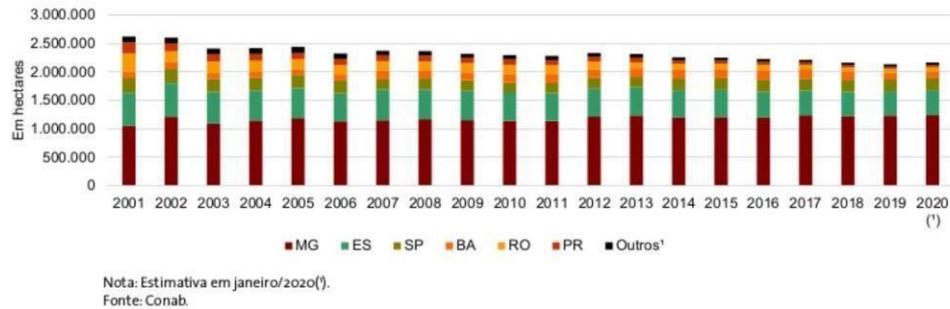


FIGURA 1. Área plantada em hectares dos principais estados produtores de café no Brasil no período de 2001 a 2020 onde 2020 é uma projeção. Fonte: Conab (2019)

A área total cultivada no país com café (arábica e conilon) totaliza 2,13 milhões hectares, 1,2% menor que a cultivada em 2018. Desse total, 319,17 mil hectares (15%) estão em formação (CONAB, 2019).

De acordo com o CONAB, (2021), a projeção da safra de 2021 é de 49 milhões de sacas, representando uma redução de 22,6% em relação à safra passada, por ser um ano de bialidade negativa. Em 2020, houve uma produção de 63,08 milhões de sacas, considerada recorde dentro da série histórica do grão. A produção do café arábica está estimada em 33,4 milhões de sacas, uma diminuição de 31,5% em comparação ao volume produzido na safra passada. Já a do conilon deve chegar a 15,4 milhões de sacas, 7,9% a mais do que em 2020, Por ser uma espécie menos afetada pelas variações da bialidade.

Gráfico 9 – Produção total de café (arábica e conilon)

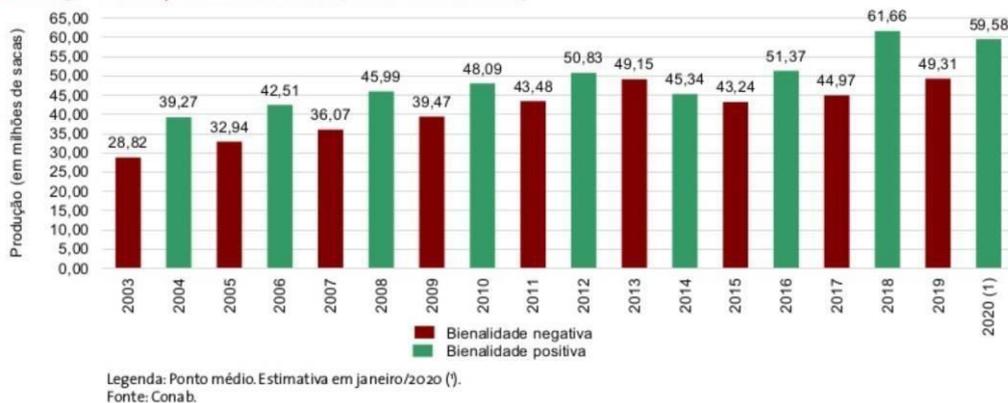


FIGURA 2. Produção total de café (arábica e conilon) no Brasil, ilustrando os anos de bialidade positiva e negativa. *Dados de 2020 são uma projeção Fonte: Conab (2019).

De acordo com dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de 2017, é responsável por gerar mais de 8 milhões de empregos no país em toda a sua cadeia produtiva, que inclui desde a produção de insumos, até o preparo para consumo, evidenciando a importância de seu papel social (DURÁN *et al.*, 2017).

3.3 Pragas do café e problemas com produtos fitossanitários

Dentre os diversos insetos praga que atacam a cafeicultura, destacam-se pela severidade do ataque e grandes prejuízos econômicos: a Broca-do-café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari 1867) (Coleoptera: Curculionidae), Bicho-mineiro *Leucoptera coffeella* (GuerinMeneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) e Ácaro-vermelho *Oligonychus ilicis* (McGregor, 1917) (Acari: Tetranychidae) (EMBRAPA, 2015).

Dentre os lepidópteros pragas, o bicho-mineiro, *Leucoptera coffeella* (GuérinMénéville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) é considerado praga-chave da cafeicultura na maioria das regiões produtoras em função dos sérios danos a lavoura, ocasionando grande prejuízo econômico (Souza *et al.* 1998).

O uso de inseticidas químicos, é o método mais utilizado para o controle de *L. coffeella* (Souza *et al.* 1998, Fragoso *et al.* 2002). Contudo, o uso inadequado, de produtos não seletivos sem a rotação de compostos ativos, tem impactado de maneira significativa, pela eliminação de insetos benéficos, explosões populacionais da praga e, principalmente, a perda de eficácia de inseticidas pela seleção de populações resistentes (Guedes & Fragoso, 1999).

3.4 Bicho-mineiro do cafeeiro

3.4.1 Fatores de ocorrência

A ocorrência do bicho-mineiro está diretamente relacionada com fatores ambientais, como baixa altitude, climas mais quentes, com baixa umidade relativa do ar e com período de veranico, que favorecem o desenvolvimento da praga. As lavouras em plantios adensados são menos atacadas, pois cria-se um microclima com maior umidade, menor insolação e ventilação, que é desfavorável ao desenvolvimento da praga. (AGUIAR *et al.*, 2000)

Geralmente, ocorrem dois picos de infestação por ano, sendo o primeiro de maio a junho e o segundo de setembro a outubro, épocas caracterizadas por baixo índice pluviométrico, sendo que a partir de novembro, com a ocorrência das primeiras chuvas, a quantidade de lesões nas folhas diminui rapidamente (CONCEIÇÃO, 2005).

No Cerrado, a alta incidência da praga é favorecida pelos períodos de estiagem, com maior ocorrência nos meses de junho a outubro, época em que se deve focar no controle de *L. coffeella* (OLIVEIRA *et al.*, 1992).

O tempo do ciclo de vida desta espécie é altamente variável em função dos fatores climáticos variando de 19 a 87 dias. Temperaturas de baixa umidade relativa são favoráveis e reduzem o tempo do ciclo. Já altos índices de precipitação pluviométrica são desfavoráveis e causam ciclos mais longos. Além disso, sua incidência também é influenciada por face de exposição e espaçamento adotado. Espaçamentos maiores, proporcionam culturas mais arejadas, o que é propício para o crescimento da praga (SOUZA *et al.*, 1998).

3.4.2 Morfologia externa

O adulto é uma mariposa de aproximadamente 6,5 mm de envergadura com coloração prateada e manchas circulares pretas e amarelo visíveis próximo às extremidades das asas anteriores. Nas asas posteriores é caracterizada pelas franjas e são cobertas pelas asas anteriores. (COSTA *et al.*, 2015).

Quando estão completamente desenvolvidas, as lagartas tem cerca de 3,5 mm de comprimento e não passam de 2 mm de comprimento total do corpo, possuindo três pernas na região torácica e cinco falsas pernas na região abdominal. Possuem aparelho bucal do tipo mastigador. O ovo do bicho-mineiro mede 0,3 e 0,25 mm, de comprimento e de largura, respectivamente, com coloração branco brilhante e de formato achatado (SOUZA *et al.*, 1998)

3.4.3. Ciclo

Seu ciclo biológico, é caracterizado pela sobreposição de gerações, com ocorrência de um grande número de gerações por ano. Normalmente a época de maior ocorrência de *L. coffeella* é durante o período seco do ano, porém, tem-se observado seu ataque mesmo na estação chuvosa, em determinadas regiões produtoras de café. (SOUZA *et al.*, 1981; TOLEDO FILHO, 1982; INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ, 1986; SOUZA *et al.*, 1998). Em média, 8 gerações podem ocorrer por ano no Brasil, chegando a 12 no período de colheita (SOUZA, 2018).

Seu ciclo é considerado holometabólico, passando por todos os estágios de desenvolvimento, sendo eles: ovo, lagarta, crisalida (pupa) e adultos (Souza *et al.*, 1998). O ciclo biológico tem duração altamente variável, de 19 a 87 dias (ovo: 5-10 dias, larva: 9-40 dias e pupa: 4-26 dias) e o período de vida do adulto é de 15 dias (FIGURA 04). (PEREIRA *et al.*, 2003).

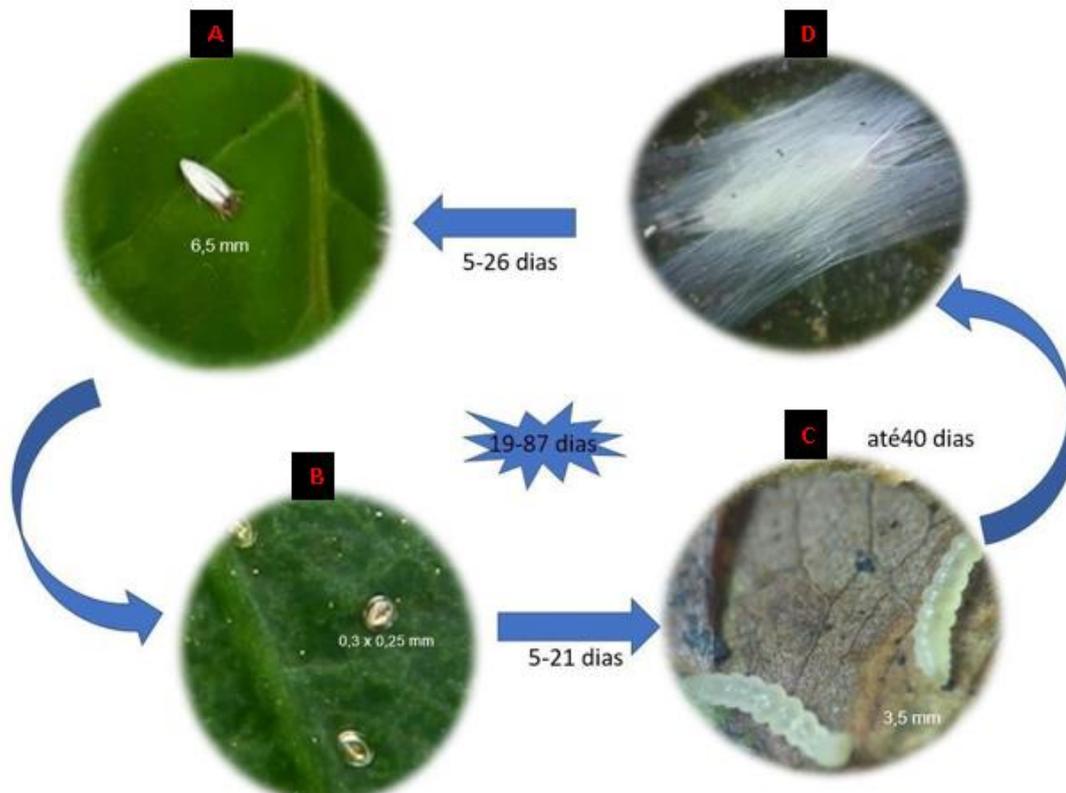


FIGURA 3. Ciclo biológico holometabólico de *Leucoptera coffeella*, passando por todos os estágios de desenvolvimento: A- adulto, B- ovo, C- larva e D- pupa. Fonte: (NUNES, 2020) *foto dos ovos: (REVISTA CAFEICULTURA, 2017).

As fêmeas depositam seus ovos na parte adaxial das folhas e têm aspecto gelatinoso e transparente. Após a eclosão dos ovos, as lagartas penetram no tecido foliar através da parte inferior do ovo, onde se alimentam de células do parênquima paliçádico, formando lesões entre as epidermes. (RAMIRO *et al.*, 2004).

Quando a lagarta interrompe sua alimentação, deixa a galeria e tece um fio de seda, descendo para o terço inferior da planta. Produz um casulo de fios de seda em formato de “x” geralmente na parte abaxial da folha, onde permanece até se tornar pupa. Este processo varia de 5-26 dias (SOUZA *et al.*, 1998).

3.4.4 Comportamento

O bicho-mineiro é uma praga considerada monófaga (REIS *et al.*, 2002). Possuem hábitos noturnos e as lagartas vivem dentro de galerias no tecido foliar que constroem ao se alimentarem do parênquima paliçádico da folha. (Souza *et al.*, 1998). Possuem dimorfismo sexual, com uma relação sexual de 1: 1 (Speer, 1949; Parra, 1985).

O acasalamento ocorre principalmente à noite (Notley, 1948), embora também

possa ocorrer em menor frequência no período da manhã, após a secagem do orvalho. (Walker *et al.*, 1969). A temperatura e umidade relativa tem influência direta nesta fase, já que a oviposição não ocorre abaixo dos 18°C (Speer, 1949; Katiyar e Ferrer, 1968).

A viabilidade e a duração da fase do ovo, também apresentam variabilidade em função da temperatura, com eclosão mais precoce em temperaturas mais altas (PARRA, 1981). Em condições de laboratório, Parra (1985), constatou que a disponibilidade de alimentos, temperaturas de 20°C a 27°C e umidade relativa quase nula, podem prolongar o tempo de oviposição da praga. Porém, reduz com temperaturas acima de 30°C.

Em média, fêmeas colocam 75 ovos em 13,4 dias nas folhas de cafeeiro suscetível (Notley, 1948), com o maior número de ovos depositados no quarto dia. A duração da fase do ovo pode ser superior a 20 dias (Katiyar e Ferrer, 1968), mas, pode decair para quatro a seis dias, nas condições ótimas estabelecidas por Parra (1985).

Verificou-se uma preferência das fêmeas por não ovipositar em folhas ovipositadas ou minadas devido a mecanismos de seleção do hospedeiro com melhor qualidade nutricional e menor competição intraespecífica para a prole. (MICHEREFF, 2000).

Também existe preferência por não ovipositar em folhas mais jovens dos dois primeiros pares (PARRA, 1975). Fator explicada pela presença de metabólitos secundários, responsáveis pela proteção das plantas contra agentes bióticos ou abióticos que é maior em folhas jovens e pode afetar o desenvolvimento da praga, aumentando a taxa de mortalidade (WALKER *et al.*, 1969).

O bicho-mineiro do cafeeiro possui quatro instares larvais e pode-se encontrar vários instares diferentes na mesma folha, ou seja, não há canibalismo. (Notley, 1948). Segundo Nantes e Parra (1977), as lagartas de terceiro e quarto instar costumam provocar danos mais graves, sendo que a maioria destes, estão localizados na terceira e quartas folhas de internódios, onde há predileção pelos insetos. O que é ainda mais prejudicial para a planta, já que a fotossíntese é muito maior nessas áreas.

Durante o último instar, a larva deixa de se alimentar e abre uma tampa em uma das extremidades da lesão e abandonam a galeria. (REIS *et al.*, 1984), tecem um fio de seda e descem aos talhões mais baixos da planta, normalmente no terço inferior, construindo um casulo de seda característico, em forma de “X”, normalmente na face adaxial da folha, onde formam as pupas, ou crisálidas (RAMIRO *et al.*, 2004).

Em estudos realizados em laboratório, com temperaturas variando de 20°C a 35°C (Parra, 1985), notou-se que a duração da fase de pupa foi de 14 dias a 20°C e 3,6 dias a 35°C. No entanto, a essa temperatura mais alta, apenas 25% atingiram a fase adulta. Deste modo, temperaturas entre 27°C e 30°C foram consideradas favoráveis ao desenvolvimento da pupa, e cerca de 95% atingem a fase adulta, em 5 dias. (Parra, 1985) sendo essa fase mais curta nas fêmeas do que nos machos (Notley, 1948; Katiyar e Ferrer, 1968).

O genótipo do hospedeiro também influencia diretamente no potencial de infestação. Culturas de *C. arabica* tem maior propensão ao ataque do bicho-mineiro que lavouras de *C. canephora* (FERREIRA et al., 1979). Quando plantadas em conjunto, há uma diminuição de infestação em plantas de *C. arabica*, e aumentam nos talhões de *C. canephora* (AVILES et al., 1983).

Explosões Populacionais também foram causadas devido modificações das formas de cultivo, como maior espaçamento e lavouras mais arejadas devido a mecanização. O crescente uso de inseticidas, principalmente os cúpricos, para o controle da ferrugem e uso de cobertura morta, causaram desestabilização do microclima, favorecendo seu desenvolvimento. (OLIVEIRA et al., 2001).

3.4.5. Prejuízos econômicos

É no mesófilo foliar que as lagartas se alojam e se alimentam, especificadamente de células do parênquima paliçádico, sendo a lagarta, a única fase capaz de prejudicar danos a lavoura (Figura 4).

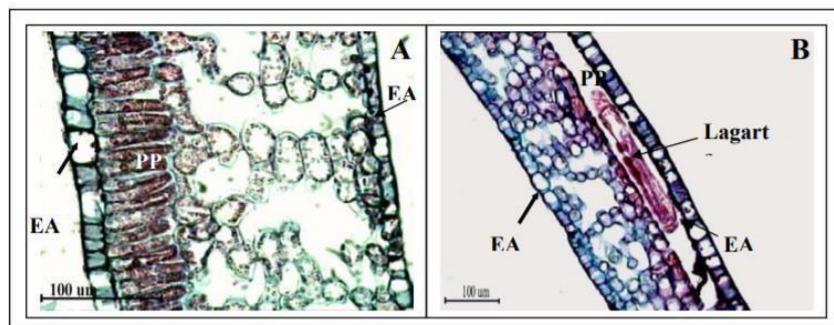


FIGURA 4. A- Corte microscópico transversal de uma folha de café sem a presença do bicho mineiro, B- lesões provocadas por *Leucoptera coffeella*. EAD = epiderme adaxial; EAB = epiderme abaxial; PP = parênquima paliçádico e PL = parênquima lacunoso. Fonte: Ramiro et al., (2004).

As lesões ou galerias, são formadas durante a alimentação da lagarta e possuem formato arredondado com bordas irregulares e coloração acastanhada, com o centro mais escuro, devido ao depósito de dejetos (REIS, 2002; SOUZA, 1998). (Figura 5).

Os prejuízos econômicos se dão pelo estabelecimento das lesões que causam redução da área foliar e conseqüentemente redução da capacidade fotossintética. Com isso, o fluxo de água, sais minerais e matéria orgânica são prejudicados, ocasionando alta liberação de etileno que provoca queda prematura da folha (SOUZA *et al.*, 1998).

A longevidade das plantas é comprometida pelo aumento do gasto energético necessário para restauração da parte aérea (Souza *et al.*, 1998), podendo levar até dois anos até sua recuperação (REIS *et al.*, 2002).

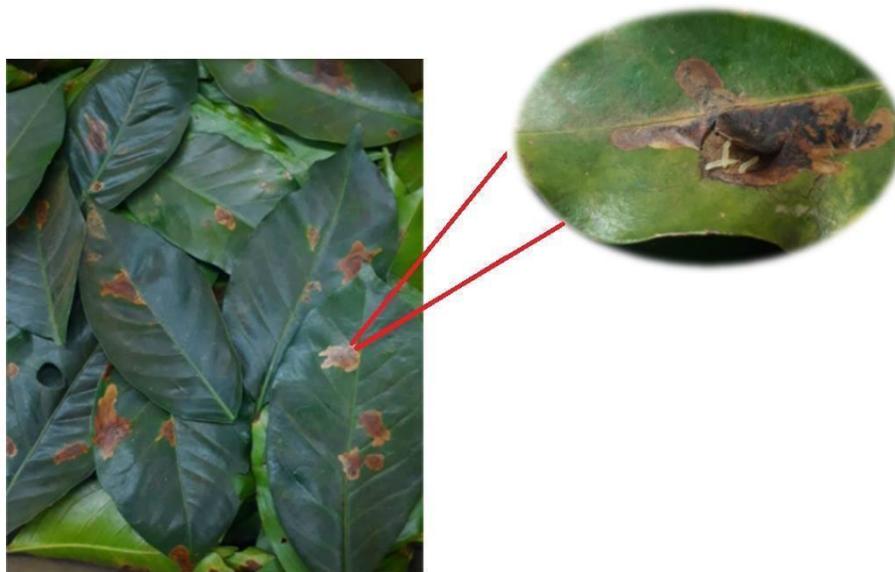


FIGURA 5. Folhas de cafeeiro com lesões provocadas pela lagarta do bicho-mineiro do cafeeiro.

Fonte: Nunes, 2020

Devido a predileção do inseto pelas terceira e quartas folhas de internódios (Nantes & Parra, 1977), os danos são acentuados, já que a fotossíntese é muito maior nessas áreas. (PARRA, 1975).

o desfolhamento ocasionado pelas lesões nos períodos até julho, impedem o desenvolvimento de gemas florais. Em setembro e outubro, causam baixa produção de frutos. Entre agosto e outubro, prejudica a formação de flores e frutos (SOUZA *et al.*, 1998). Desfolhas de 61% resultam em perda de matéria no tronco, 60% nas raízes e redução de 50% da atividade fotossintética. (KONNOVA & DE LA VEGA 1985).

Nos períodos de seca, a redução da área foliar pode chegar a 75%, resultando em prejuízos de 87% na produção (PARRA, 1975). Climas quentes entre 27°C e 30°C e alta umidade relativa favorecem sobreposição de gerações, encurtando a fase larval em cultivar

Mundo Novo para 7 a 11 dias. Em torno de 20°C, a fase larval varia de 16 a 26 dias (Parra, 1985).

Segundo Oliveira *et al.* (2001) a intensidade de infestação do bicho mineiro pode não ser constante, apresentando grande variação de ano para ano entre as regiões de plantio. Segundo Amaral (1953) cafeeiros com localização exposta a alta intensidade de ventos podem intensificar o ataque do bicho-mineiro. Já o excesso de umidade pode causar maior mortalidade.

3.4.6. Métodos de Controle e monitoramento

Embora o dano econômico seja causado pelas apenas pela fase larval, conhecer o ciclo biológico é fundamental para o planejamento de métodos de controle. Características como fecundidade, preferência por determinadas linhagens de hospedeiros e suscetibilidade ou resistência a determinadas substâncias químicas podem ser determinantes.

De acordo com Reis e Souza (1996), o nível ideal para se iniciar o controle dessa praga é de 20 a 30% de folhas minadas, podendo ser mais flexível em regiões com climas mais amenos e mais rígido em regiões com temperaturas mais altas. É importante a obtenção de um método de monitoramento que indique o nível populacional a distribuição do inseto, para a tomada de decisão no controle da praga.

Porém o monitoramento ainda é precário devido ao método empregado de contagem de folhas minadas ou armadilhas distribuídas nas lavouras. Contudo, já existem métodos de captura de imagens aéreas e fotogrametria para aprimorar a detecção da praga nos campos (SOUTO, 2019; VASCONCELOS, 2019).

Segundo Souza *et al.* (2006), há o controle preventivo que é realizado durante períodos chuvosos, com inseticidas sistêmicos granulados. Mas sua eficácia não é assertiva, devido a padrões irregulares de chuva e método de aplicação não direcionado as folhas.

O principal método de controle é ainda é o uso de inseticidas, sendo os principais: thiametoxan (Souza *et al.*, 2006), clorantraniliprole (Fragoso *et al.*, 2002) e cloridrato de cartap (Melo *et al.*, 2019).

Porém, o uso contínuo desses produtos não seletivos, combinados com a não rotação de produtos, pode causar desequilíbrios ambientais, eliminação de insetos benéficos e inimigos naturais, explosões populacionais da praga, e perda de eficácia de inseticidas devido a seleção de populações resistentes (KAY e COLLINS, 1987; GUEDES e FRAGOSO, 1999).

Há relatos em que 94% das populações de BMC no estado da Bahia são resistentes ao ingrediente ativo chlorantraniliprole (LEITE *et al.*, 2020).

3.5. Controle biológico

São utilizados inimigos naturais, capazes de controlar a população de bicho- mineiro abaixo do nível de dano. Há um grande número de insetos benéficos, descritos como capazes de controlar a incidência desta praga (SOUZA, 2002). Alguns microorganismos patógenos como bactérias e fungos também podem colaborar no controle do bicho-mineiro. Segundo (ROBBS *et al.*, 1976),

As principais vespas predadores do bicho-mineiro na fase de lagarta são pertencentes ao gênero *Brachygasstra* (*B. augusti*, *B. lecheguana*), *Polistes* (*P.lanio*, *P.versicolor*), *Polybia* (*P.scutellaris*), *Protonectarina* (*P. silveirae*) e *Synoeca* (*S.surinama cyanea*). Sendo *B. lecheguana* e *P. sylverirae* as mais comuns. (REIS *et al.*, 1984). Representam um contro até 69% de controle ao se alimentar das lagartas diretamente das lesões foliares (GALLO *et al.*, 1978; REIS e SOUZA, 2002).

Segundo Mendes (1940) há cerca de 32 parasitoides capazes de promover o controle do bicho-mineiro, sendo eles pertencentes da família: Braconidae (5 espécies), Elachertidae (1 espécie), Elasmidae (1 espécie), Eulophidae (24 espécies) e Pteromalidae (1 espécie) e 8 delas são encontrados no Brasil. O controle varia entre 16 e 20% (REIS *et al.*; 1975).

Em condições de laboratório, verificou-se que larvas do predador *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) conseguem preda as fases de pré-pupa e pupa do bicho-mineiro, mas não conseguem preda as fases de ovo e lagarta (GRUPO CULTIVAR, 2002).

Recomenda-se que quando há sinais de 40% de predação por vespas, não há mais necessidade de usar produtos-químicos. (Torres *et al* 2009). Destaca também, a importância da incorporação de controles culturais, como quebra-ventos ao redor das lavouras, assim como a diversidade vegetal dentro dos próprios cafezais, conhecido como sistema agroflorestal, que além de servir como abrigo de ninhos de vespas, também aumentam a variabilidade de inimigos naturais (REIS *et al.*, 1984).

A partir de avaliações de índices populacionais realizados por cerca de vinte anos, constatou-se que de modo geral, os maiores níveis populacionais dos inimigos

naturais sempre coincidem com os picos populacionais de *L. coffeella*. Os autores atribuem o uso inadequado de inseticidas químicos, a eliminação de inimigos naturais e o conseqüentemente, explosões populacionais de *L. coffeella* (GONÇALVES *et al.*, 1978)

As bactérias *Erwinia herbicola* e *Pseudomonas aeruginosa* são patogênicas as lagartas do bicho-mineiro com capacidade expressiva de controle. (ROBBS *et al.*, 1976). O fungo *Metarhizium anisopliae* é patogênico a ovos e lagartas de *L. coffeella* (APUD; VILLACORTA, 1983). A espécie *Beauveria bassiana* infecta as larvas do último instar no momento que elas deixam as minas para formação das pupas (DRAGANOVA & TOMOY, 1998).

3.5.1 Os fungos como agentes de controle biológico

3.5.2 Características gerais e diversidade de fungos patogênicos

Os fungos entomopatogênicos são um grupo de micro-organismos com ampla filogenia, sendo heterotróficos, eucariotos, unicelulares ou multicelulares (filamentosos) podendo se reproduzir de maneira sexual, assexual ou ambos. Possuem células quitinizadas e são geralmente não móveis (BADII & ABREU, 2006).

O termo entomopatogênico define micro-organismos capazes de atacar os insetos utilizando-os como hospedeiros intermediários para desenvolver parte do seu ciclo de vida (DEVOTTO *et al.*, 2000), podendo reduzir as populações de insetos praga e níveis abaixo de danos econômicos. (TANZINI *et al.*, 2001), e inclusive ser utilizados como controle de insetos vetores de doenças (SCHOLTE *et al.*, 2004).

Podem ser parasitas facultativos ou obrigatórios de insetos, com alta capacidade de esporulação e sobrevivência. Aproximadamente 80% das doenças ocorrentes em insetos, são causadas por fungos. (BATISTA, 1989) e praticamente todos os insetos são susceptíveis a doenças causadas por fungos. Há fungos que podem colonizar insetos mortos, classificados como saprófagos (necrófilos) e fungos entomófagos que infectam insetos vivos (BUTT *et al.*, 2006).

O cálculo da diversidade fúngica no mundo foi estimado em 1.5 a 5.1 milhões de espécies (HIBBETT *et al.*, 2011), sendo que apenas 100,000 foram descritos (VEGA *et al.*, 2012). Destes, aproximadamente 750-1000 são fungos entomopatogênicos classificados em uma diversidade de 100 gêneros (ST. LEGER & WANG, 2010).

Os fungos entomopatogênicos constituem o maior número de táxons de patógenos de insetos (IGNOFFO, 1973) e já são amplamente empregados no controle biológico de insetos pragas e alguns destes, podem ser encontrados colonizando a planta hospedeira de forma endófito, como por exemplo, a *Beauveria bassiana*, encontrada colonizando os de milho e conferindo proteção contra o ataque de insetos. (BING & LEWIS, 1993).

De Faria e Wraight (2007), identificaram 171 produtos baseados em fungos usados como agentes de biocontrole desde 1960, a maioria deles com *Beauveria bassiana*, *B. Brongniartii*, *Metarhizium anisopliae* e *Cordyceps fumosorosea*.

3.5.3 Modo de ação

O modo de ação ocorre em três fases: (1) adsorção dos esporos à superfície através do reconhecimento de receptores específicos de natureza glicoproteica no inseto, (2) a adesão ou a consolidação entre o esporo pré-germinado e a epi cutícula e (3) a germinação e desenvolvimento até a formação de apressórios para iniciar a fase de penetração (TELLEZ *et al.*, 2009)

Em primeiro lugar, é necessário a liberação em massa de um número mínimo de esporos para conseguir infecções previsíveis (INGLIS *et al.*, 2012). O processo de adesão é mediado pela adesina, uma molécula sintetizada pelo fungo. (PAVA-RIPOLL *et al.*, 2011). ou podem ser misturados com substâncias adesivas para aderir a cutícula do hospedeiro (VEGA *et al.*, 2012), e ocorre por contato direto com cadáveres infecciosos, hospedeiros suscetíveis, ou indiretamente através de esporos no ar, na vegetação, no solo (HESKETH *et al.*, 2010) ou sobrevivendo a uma ingestão oral (COLE & HOCH, 1991; VEGA *et al.*, 2012).

Esta ligação envolve mecanismos não específicos de adesão controlados pelas propriedades hidrofóbicas da parede celular dos conídios (BOUCIAS *et al.*, 1988). Guiados pela interação entre as proteínas (hidrofobinas) dos conídios e a superfície hidrófoba do exoesqueleto dos insetos. (FANG *et al.*, 2005).

A germinação na cutícula, ocorre quando o conídio encontra condições favoráveis químicas e físicas como umidade, temperatura, e exigências nutricionais para produzir estruturas de penetração (tubos germinativos, apressórios ou substâncias mucilaginosas aderentes para possibilitar a formação do tubo germinativo que vai penetrar através de poros ou camadas mais externas da epicutícula (SHAH & PELL, 2003).

As proteínas cuticulares podem variar de acordo com o estágio de desenvolvimento do inseto (WILLIS *et al.*, 2005). A cutícula é rompida por pressão mecânica exercida pelo haustório e processos químicos de enzimas degradadoras (hidrolise como proteases, lipases e quitinases) para que o fungo possa obter a nutrição e colonizar o inseto (MONZON, 2001). A digestão do tegumento segue uma sequência de lipase - protease- quitinase (TANADA & KAYA, 1993).

Outro mecanismo de penetração é através da cavidade oral, espiráculos e outras aberturas naturais do inseto. No trato digestivo, os esporos encontram condições ideais de umidade, possibilitando sua rápida germinação. Porém, a digestão podem degradar as hifas de germinação, ou até causar a morte por toxicidade. (CHARNLEY, 1992).

Em seguida, ocorre a proliferação na hemocele, músculos ou outros tecidos (VEGA *et al.*, 2012). Os sintomas da infecção fúngica englobam convulsões, descoordenação motora e paralisia. A morte ocorre por uma combinação de fatores físicos (danos aos tecidos, toxicidade, desidratação celular por perda de fluidos e nutrientes (BUSTILLO, 2001).

Em temperatura e umidade favoráveis, as hifas emergem para o exterior do tegumento do inseto, através da membrana intersegmentar ou espiráculos, dependendo do hospedeiro e estágio de desenvolvimento. A duração desta fase vegetativa, varia entre espécies e clima (CARRUTHERS & SOPER, 1987).

E assim passam da fase vegetativa para a reprodutiva (esporulação) em 24 a 48 h, dependendo da umidade relativa e síntese de antibióticos para evitar o crescimento de organismos oportunistas (SRIVASTAVA *et al.*, 2009). As hifas formam conidióforos que originam conídios, com função de disseminação (CAÑEDO & AMES, 2004). Sua produção, sobrevivência e germinação é controlada por fatores ambientais, sendo determinantes para processos de epizootias (CARRUTHERS & SOPER, 1987).

A esporulação ocorre normalmente em cadáveres, mas também pode ocorrer em insetos vivos (TANADA & KAYA, 1993). A dispersão de esporos pode ser um processo ativo ou passivo e depende das características do esporo e esporângio (TANADA & KAYA, 1993).

3.5.4 Fungos endofíticos

Os microrganismos endofíticos, são aqueles que colonizam o interior dos órgãos e tecidos de plantas, em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, sem causar danos aparentes

ao hospedeiro (PETRINI, 1991), diferenciando-se dos epifíticos, que colonizam a superfície dos órgãos das plantas. Essa classificação é puramente topográfica, e não modifica as características do organismo (Azevedo, 1998). Endófitos podem ser encontrados em uma grande diversidade de plantas, desde árvores de grande porte, palmeiras e até mesmo líquens. (Hyde, 2008).

Essa interação mutualística sugere uma coevolução endófito-hospedeiro, visto que a planta oferece vantagens ao endófito, como fornecimento de nutrientes e um ambiente com menor competição de outros organismos e em troca recebe a produção de enzimas, alcaloides e antibióticos, aumentando a resistência da planta contra agentes bióticos (herbivoria e microrganismos patogênicos) e abióticos (pH, temperatura e estresse hídrico). (ESPOSITO & AZEVEDO 2010).

Por conta dessa interação, diversos compostos de natureza vegetal, foram documentados sendo produzidos também por endófitos, o que pode indicar uma transposição de genes entre a planta e o fungo. (AZEVEDO, 1998).

Os fungos endofíticos também podem atuar como fungos antagônicos, podendo ocorrer de forma indireta, competindo por espaço e nutrientes, produzindo antibióticos e inativando a produção de enzimas ou de forma direta, como micoparasitas, onde produzem enzimas capazes de degradar a parede celular do fungo parasita e extrair os nutrientes do hospedeiro (CAO et al., 2009; LEITE, 2010).

Diversos estudos foram realizados acerca das da sua relação e função simbiótica com a planta hospedeira, como resistência a herbivoria (CLAY, 1988), aumento da área foliar (READ & CAMP, 1986), tolerância a períodos de estiagem (WEST *et al*, 1990), resistência a doenças (STOVALL & CLAY, 1991), uso como vetores de características genéticas desejáveis nas plantas (MURRAY *et al*, 1992), produção de fitohormônios que conferem vantagens ao crescimento e desenvolvimento da planta (STROBEL, 2003), controle biológico de pragas (AZEVEDO *et al*, 2007) e bioindicadores de deficiência nutricional (BLODGETT *et al*, 2007).

Azevedo & Araújo (2007), divide os endófitos em: Tipo I, (os que não produzem estruturas externas à planta) e tipo II (os que produzem estruturas externas à planta). Ainda podem ser divididos quanto ao seu crescimento, sendo: 1) crescem ativamente no hospedeiro, com colonização generalizada, 2) crescem ativamente no hospedeiro, colonizando áreas limitadas, 3) crescem pouco no hospedeiro, de forma localizada até a senescência vegetal e 4)

crecem pouco no hospedeiro, mas permanecem metabolicamente ativos (RODRIGUES & REDMAN, 1997).

A maioria dos endófitos são classificados como Ascomycota e seus anamorfos (grupos antigos que coevoluiram com as plantas) (HECKMAN *et al.*, 2001), mas também há Basidiomycota e Zygomycota em menor frequência, o que pode ser explicado pela falta do uso de meios específicos em laboratório, impossibilitando seu crescimento. (BERBEE, 2001).

Os fungos endofíticos são encontrados em maior variabilidade e produzindo maior número de metabolitos secundários em regiões tropicais em comparação com regiões temperadas. Porém, foram documentados habitando uma ampla diversidade de ambientes, desde plantas no Ártico, Antártica, solos geotérmicos, até desertos, oceanos, florestas tropicais, mangues e florestas costeiras (JALGAONWALA *et al.*, 2011, ARNOLD, 2007).

O sistema de cultivo da plantação também influencia na variabilidade de endófitos encontrados, sendo mais presentes em cultivo orgânico. (CAMATTI-SARTORI *et al.*, 2005). Normalmente, centenas de espécies de endófitos podem ser isolados de uma única planta, sendo que pelo menos um é específico ao hospedeiro. (TAN *et al.*, 2001)

Outro fator de influência é o tipo de órgão vegetal e idade da planta. O maior grau de colonização foi encontrado em folhas > caule > raiz e foi crescente durante o ciclo de vida de algodoeiros. A ocorrência de fungos endofíticos em semente de algodoeiro também sugere que há transmissão vertical desses microrganismos por sementes (Vieira *et al* 2011).

Apesar de algumas espécies de endófitos serem descritos colonizando diversas plantas diferentes, Carroll (1988), sugere que os fungos endofíticos apresentam especificidade quanto a gênero ou família do hospedeiro, onde seu comportamento, pode variar de um hospedeiro para outro. Segundo GamboaGuaitan (2006), esta especificidade representa melhor repartição de recursos disponíveis, o que diminui a competição entre endosimbiontes.

Os fungos endofíticos podem ser extraídos de folhas, caules, raízes e estruturas florais (SILVA *et al*, 2006). Rodrigues *et al* (1994) observou especificidade por tecidos foliares. A variabilidade de espécies depende de fatores climáticos, local de coleta, fase de crescimento e idade da planta segundo Azevedo., (1998).

Para seu isolamento, é necessário um processo de desinfecção superficial para retirada de contaminantes e organismos epifíticos, cujo processo, varia em tempo de exposição e reagentes utilizados, dependendo da espessura do tecido foliar. (MENDES & AZEVEDO,

2007). Uma técnica alternativa, é a utilização de técnica molecular (PCR), usada na identificação dos fungos, através de extração de DNA, não necessitando assim, do crescimento fúngico. Porém, esta técnica não permite a seleção de organismos cultiváveis em laboratório (LAVACA *et al.*, 2006).

Durante o isolamento, a composição do meio de cultura se faz importante. Os meios mais utilizados são o extrato de malte e batata-dextrose-ágar (BDA) ou o extrato da própria planta onde o fungo foi isolado (ARNOLD, 2005). O uso de antibióticos também pode ser agregado ao meio, afim de evitar o crescimento de bactérias (GAMBOAGAITAN, 2006).

3.5.4.1 Mecanismos de ação

Os mecanismos de colonização dos micro-organismos endofíticos são semelhantes aos dos fungos fitopatógenos (BOGAS, 2010).

A colonização pode ser vertical, quando adentram no tecido foliar pelas sementes ou raiz, ou horizontal, quando utilizam as folhas como porta de entrada, através de entradas naturais dos estômatos, ou ocasionadas pelo crescimento das raízes, lesões foliares ou penetração mecânica pela parede celular, utilizando apressórios e haustórios (SAIKKONEM *et al.*, 2004).

O modo de infecção pode alterar o tipo de interação endófito-hospedeiro. Na transmissão vertical é predominante a interação mutualística, enquanto que na transmissão horizontal (não-sistêmica) essa interação tende a ser antagonista. (ALY *et al.*, 2011).

Dentro do tecido vegetal, os fungos podem permanecer próximo ao local de penetração ou disseminar-se pelo sistema vascular (ZINNIEL *et al.*, 2002), podendo ser intercelulares, intracelulares ou se desenvolver em qualquer tecido da planta, de folhas caules e raízes até pólem, ovários e estames. (JOHRI, 2006).

A relação planta/ endófito pode ser: simbiótica, antagônica ou neutra. Na simbiose, o fungo produz, ou induz a produção de metabolitos primários e secundários que beneficiam a planta, trazendo diminuição da herbivoria ou resistência a estressores abióticos. (ARAUJO, 1996).

Também podem induzir a resistência sistêmica (IRS), mecanismo ativado na penetração do fungo endofítico, que induz a produção de compostos de proteção ou alterações morfológicas, como aumento da parede celular por acúmulo de lignina, glucanase, aumento da

espessura da cutícula e a síntese de fitoalexinas (compostos antimicrobianos), que impedem o processo de infecção e colonização do patógeno (PEIXOTO-NETO, 2002; BERNARDIWENZEL *et al.*, 2012).

No controle biológico de pragas, esses fungos desenvolvem mecanismos especializados de degradação enzimática do tegumento do inseto alvo, afim de driblar compostos de defesa produzidos pelo inseto. As relações para obtenção de energia do fungo a partir de seu hospedeiro, pode ser classificada em: biotrofia (nutrição a partir de células vivas), necrotrofia (nutrição de tecidos mortos) e hemibiotrofia (inicialmente biotrófico e posteriormente necrotrófico) (CHARNLEY; COLLINS 2007).

A maioria dos estudos atribui a mortalidade de insetos-praga por fungos entomopatogênicos devido a acumulação de micotoxinas/metabólitos secundários nos tecidos da planta, o que pode causar diminuição da alimentação de herbívoros, antibiose em fungos patógenos e repelência (VEGA, 2008).

O uso de microorganismos endofíticos representam uma importante alternativa aos produtos fitossanitários convencionais, visando diminuir as infecções de patógenos e populações de insetos-praga e muitas vezes, possibilitando um efeito sinérgico quando utilizado em conjunto com produtos compatíveis, no combate de doenças e pragas. (BACKMAN; SIKORA, 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta de amostras

O projeto de pesquisa foi desenvolvido na Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico (IB), de Campinas-SP. As amostras foram coletadas em quatro propriedades diferentes, localizadas nas regiões do circuito das Águas Paulista e Mogiana, no período de agosto de 2019. Sendo elas, Sítio Guerra (Itapira-SP), Fazenda Fronteira (Socorro-SP), Café dos Leais (Serra Negra- SP) Estância Santa Cecília (Águas de Lindóia – SP). (Figura 6).



FIGURA 6. Localização das quatro propriedades rurais da região do circuito de águas paulista e mogiano, onde foram coletados folhas, caules e raízes para o isolamento de fungos endofíticos. Fonte: (NUNES, 2020).

TABELA 1. Caracterização de latitude, longitude e altitude dos locais de coleta de folhas de café para isolamento de fungos endofíticos, realizado no laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico em novembro de 2020.

Nome da propriedade	Local da propriedade	Coordenada latitude	Coordenada longitude	Altitude (m)
Sítio Guerra	Itapira- SP	22°28'15"S	46°41'02"O	685
Fazenda Fronteira	Socorro-SP	22°34'08"S	46°25'57"O	1300
Café dos Leais	Serra Negra – SP	22°33'07"S	46°46'18"O	682
Estância Santa Cecília	Águas de Lindóia- SP	22°26'48"S	46°35'44"O	1002

As propriedades escolhidas não utilizam defensivos químicos para o controle de pragas e doenças. Nas plantas amostradas também foram coletadas informações a respeito da incidência e grau de infestação de *Leucoptera coffeella* (bicho-mineiro). As plantas foram escolhidas ao acaso, percorrendo-se os cafezais em ziguezague.

Foram coletadas amostras de 5 plantas adultas de cafeeiros em produção por região. Cada amostra foi constituída de folhas ,caules ortotrópicos e plagiotrópicos da porção mediana da planta e raízes, representando as posições Norte, Sul, Leste e Oeste .



FIGURA 7. Material (folhas, caules e raízes) coletados de Serra Negra Águas de Lindóia, Socorro e Itapira, para o isolamento de fungos endofíticos no laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas, em novembro de 2020

4.2. Isolamento de fungos endofíticos

No URL de controle biológico do Instituto Biológico, as amostras foram lavadas com detergente e água corrente visando a retirada de microrganismos epífíticos. Em fluxo laminar, as folhas foram cortadas em fragmentos retangulares, com corte próximo a nervura central, visando aumentar a área de contato do mesófilo foliar e do meio de cultura.

Posteriormente, foi utilizado o método de esterilização profunda em fluxo laminar, descrito por Araujo *et al.* (2002). que constituiu em imergir o material em álcool a 70% por 3 minutos, Hipoclorito de Sódio com 3% de Cloro ativo por 10 minutos, álcool a 70% por 1 minuto e enxágue por 2 vezes em água destilada autoclavada. Uma gota desta última, foi colocada em placa de Petri contendo o meio BDA, afim de verificar a eficácia da esterilização. (Figura 8).

Depois de esterilizado, o material foi seco em papel filtro e depositado em placas contendo BDA e uma concentração de antibiótico e incubadas a 25° C em BOD com fotófase de 12 horas por 10 dias. Assim que houve a expressão fúngica, cada fungo foi isolado em novas placas de Petri contendo meio de cultura BDA em repetições de 10 placas por isolado.

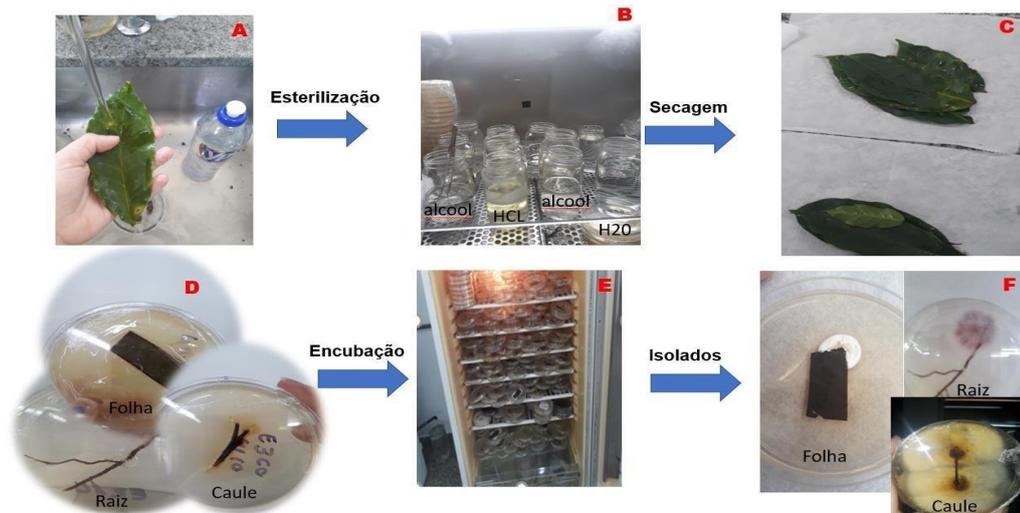


FIGURA 8. Processo de desinfecção de amostras para o isolamento dos fungos endofíticos, descrito por Araújo *et al.* (2002) e adaptado. A-esterilização superficial com água corrente e detergente, B- esterilização profunda com emersão de amostras em álcool 70% por 3 minutos, HCl por 10 minutos, Alcool 70% por um minuto e enxague por duas vezes em água destilada estéril., C- secagem, D- deposito do material em placas de Petri contendo BDA , E- Incubação em BOD por 7 dias a 25°C e F- obtenção dos isolados endofíticos .

4.3. Preservação de fungos endofíticos

Para preservação do material isolado, foi utilizado o método Castellani, que consiste na inoculação do material a ser preservado em pequenos frascos de vidro, com capacidade para 6 ml.

Os frascos foram preenchidos com 4 ml de água destilada e tampados com algodão e papel alumínio, previamente esterilizados em autoclave. Depois de esfriados, foram recortados com auxílio de lâmina esterilizada, pequenos quadrados contendo meio de cultura e micélio fúngico, que foram depositados dentro dos frascos, posteriormente vedados com tampas de borracha e plástico filme (Figura 9).



FIGURA 9. Método Castellani utilizado para preservação de fungos endofíticos utilizando frascos de vidro autoclavados, contendo água destilada estéril e vedação com tampa de borracha e plástico filme.

4.4. Identificação morfológica de fungos

A classificação morfológica dos fungos foi feita através do método realizado por Carvalho & Pereira (2016), para classificação macroscópica de morfoespécies, que constitui a análise morfológica de coloração (frente e verso); textura (altura dos micélios aéreos que se classifica em algodonosa (micélio aéreo alto e denso), aveludada (micélio aéreo baixo), granular (superfície plana e esfarelenta) e glabra (sem micélio aéreo/leveduras) e topografia da colônia, que pode ser rugosa (sulcos profundos/raios a partir do centro), umbilicada (elevação central) e verrucosa (superfície franzida e retorcida). Com isso, foi possível realizar o agrupamento de características, criando-se grupos com os isolados mais frequentes, denominados por números romanos.

4.5. Teste entomopatogênico em larvas de *G. mellonella*

Após o isolamento e preservação dos fungos obtidos de folhas, raízes e caules das plantas de café, realizou-se um *screening* com larvas de *Galleria mellonella* da criação do laboratório da ULR- Controle Biológico do Instituto Biológico, a fim de selecionar os fungos com melhor potencial entomopatogênico.

Nas condições de laboratório, foram escolhidas larvas de *G. mellonella*, que mediam aproximadamente 1 cm, se aproximando do tamanho do 4º instar larval de *L. coffeella*, que é o instar mais suscetível a ação de fungos entomopatogênicos. Foram feitas cinco repetições para cada isolado contendo 5 larvas de *G. mellonella* cada uma. Na testemunha, as larvas foram tratadas com água destilada e 0,1% de Tween 20.

Para preparar o inóculo, os isolados foram cultivados em BDA e incubados a 25 °C até esporulação. Os conídios foram removidos com alça de níquel estéril, adicionados em tubos de ensaio contendo 10 mL de água destilada estéril+espalhante adesivo e foi submetida a agitador por 1 minuto. A concentração de conídios foi ajustada em câmara de contagem de Neubauer para 1×10^8 conídios /ml-1.

O método para avaliar a patogenicidade consistiu na imersão das larvas vivas por um minuto na suspensão de cada isolado, foram secas com papel filtro e transferidas para câmara úmida, fornecendo alimento com dieta específica e incubadas durante 10 dias a 25 °C. As avaliações foram realizadas por meio da observação diária da mortalidade de larvas e através da observação dos sintomas e sinais da doença.

Uma vez constatada a morte, esta era transferida para câmara úmida contendo papel filtro umedecido e incubadas por 7 dias a 25°C para observação da expressão fúngica no tegumento do inseto, constatando características semelhantes macroscópicas e microscópicas com os fungos inicialmente inoculados.

Nesse período, foi calculada, para cada isolado, a porcentagem de mortalidade acumulada [= (número de indivíduos mortos/número total de indivíduos) *100] (RODRIGUEZ *et al.*, 2006; DIAZ *et al.*, 2010; FAJARDO & CANAL, 2010).

Os fungos endofíticos que demonstraram maior patogenicidade em larvas de *G. mellonella* foram avaliados quanto a ação entomopatogênica sobre o inseto-praga *Leucoptera coffeella* (bicho-mineiro). Também foram testadas dois isolados da coleção de fungos entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu” do URL de controle biológico do instituto Biológico, o IBCB 130 (*Cordyceps fumosorosea*) e IBCB425 (*Metarhizium anisopliae*), Ambos isolados originalmente de plantas de soja.

4.6. Teste entomopatogênico em larvas de bicho-mineiro

Nas condições de laboratório, foram testados os isolados em folhas infestadas com larvas de bicho-mineiro, mantidas em gaiolas plásticas contendo esponja fenólica umedecida. As espojas foram cortadas em formato circular e depositadas dentro de cada gaiola, tendo a função de dar suporte ao pecíolo foliar e manter a umidade necessária para a preservação das folhas (FIGURA 10).

A preparação dos inóculos foi feita a partir de diluição seriada e a concentração foi ajustada para 1×10^8 conídios⁻¹ em câmara de Neubauer. Com o auxílio de uma lupa, e luz fria,

as lesões foliares com *L. coffeella* eram identificadas. Assim, foram feitas pequenas incisões nas minas, com o auxílio de lâmina esterilizada para aplicação da suspensão fúngica com pipeta de forma a inundar a mina. Após 1 minuto, era-se retirado o excesso de água com papel filtro e as folhas inoculadas eram depositadas nas gaiolas.

Cada tratamento consistia em 5 repetições, com no mínimo 5 indivíduos cada e uma testemunha, onde as minas foram inoculadas com água estéril + Tween 20.



FIGURA 10. A- Esponja fenólica, B- Esponja fenólica cortada em círculos e utilizada na montagem das gaiolas onde foram depositadas folhas infestadas com bicho-mineiro, C- incubação das gaiolas em sala climatizada a 25°C com fotofase de 12 horas.

Durante as análises diárias, as folhas de cada gaiola eram examinadas em lupa, anotando-se dados como mortalidade e sua localização (lagarta morta dentro ou fora da mina), número de puas e sua localização (na folha ou na gaiola), comportamento (lentidão, movimentos fora do padrão, espasmos) e coloração (saudável, escura ou fora dos padrões).

O indivíduo morto, era retirado da gaiola e depositado em câmara úmida em placas de Petri, contendo papel filtro umedecido com 1,5 ml de água destilada autoclavada que posteriormente eram encubadas em BOD a 25°C com fotofase de 12 horas. O fungo que emergia do cadáver, era isolado em placas de Petri contendo meio BDA (Figura 11).

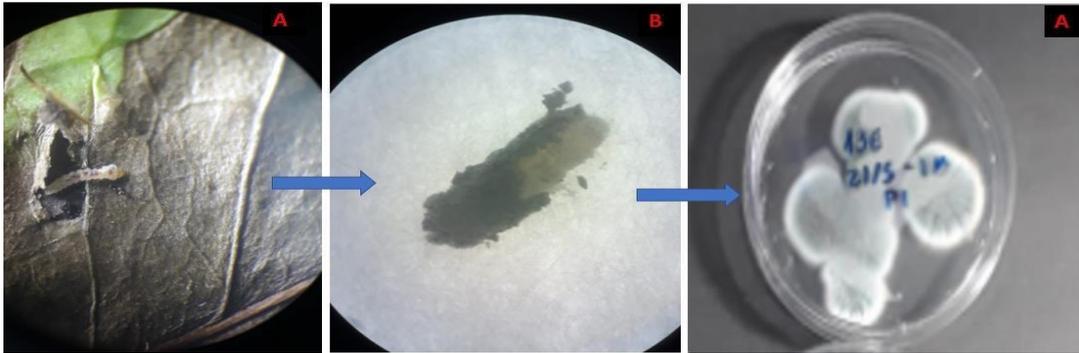


FIGURA 11. Teste de potencial entomopatogênico de fungos endofíticos sobre *L. coffeella* realizado no laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas, em março de 2021 onde: A- lagarta de *L. coffeella* morta em folha inoculada com o fungo *A.fumigatus*. B- transferência do cadáver infectado para câmara úmida encubada em BOD por 7 dias até o surgimento do fungo e C- replicação em placas de Petri contendo meio de cultura BDA.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente através do emprego de software específico e foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 1 a 5 % de probabilidade.

4.7. Impactos de produtos químicos no crescimento e na conidiogênese de fungos endofíticos

O experimento foi conduzido afim de analisar os efeitos dos agrotóxicos utilizados no cafeeiro para o controle do bicho-mineiro sobre os fungos endofíticos patogênicos isolados de folhas, caules e raízes de cafeeiro, analisando os efeitos sobre o crescimento vegetativo, esporulação e viabilidade de conídios na presença dos produtos analisados. Foram testados 6 produtos fitossanitários de amplo uso na cultura do café (Tabela 2).

TABELA 2. Informações dos produtos fitossanitários registrados para a cultura do cafeeiro (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com concentrações recomendadas pelo fabricante, utilizados nos experimentos de interação com produtos fitossanitários, realizado no laboratório de Controle Biológico do Instituto biológico de Campinas- SP, em dezembro de 2020.

Ingrediente ativo	Grupo	Classe	Dose recomendada	Modo de ação
Tiofanato-metilico 875WG (Cercobin)	Benzimidazol	Fungicida	500-700g/ha	Montagem de β -tubulina na mitose
Mancozebe 800 W (Emzeb)	Ditiocarbamatos	Fungicida de contato	400l/ha	Multissítio
Tiametoxam 250 WG (Actara)	Neonicotinoide	Inseticida sistêmico	50ml/ planta	nicotínicos da acetilcolina
Clorotalonil 500 SC (Bravonil)	Isofitalonitrina	Fungicida de contato	2-3kg/ha	Esgotamento de grupos tiol dos sistemas enzimáticos do fungo
AzoxistrobinaWG (Amistar)	Estrobilurina	Fungicida sistêmico	600-1000l/ha	anti-esporulante
Piraclostrobina 250 EC (Comet)	Estrobilurina	Fungicida Sistêmico	0,4-0,8l/ha	Inibidor de ATP

Foram preparadas três placas de Petri (15x90 mm) por tratamento, contendo 100 mL de meio de cultura junto com os produtos fitossanitários com as concentrações recomendadas (Tabela 2). Após a solidificação do meio foi realizado a inoculação dos fungos.

A inoculação foi realizada por meio de uma alça de platina, em três pontos equidistantes por placa, totalizando 9 colônias de fungo por tratamento, das quais três foram escolhidas aleatoriamente, resultando assim, em três repetições por tratamento. O tratamento testemunha foi representado pelo meio de cultura sem a adição dos produtos.

Após a inoculação dos fungos, as placas foram mantidas em câmaras tipo BOD para promover a incubação a 25°C e fotofase de 12 horas, por sete dias. Após esse período, foi realizada a medição do diâmetro das colônias em dois sentidos perpendiculares, obtendo o diâmetro médio. Para isso foi utilizada uma régua em cm para avaliação do crescimento vegetativo.

Para avaliação da conidiogênese, essas colônias foram retiradas das placas, com o auxílio de um bisturi, juntamente com o meio de cultura, e transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de água destilada e esterilizada mais espalhante adesivo (Tween 80®) a 0,1%. Para promover a desagregação dos conídios do meio de cultura foi necessário realizar uma agitação, em vórtex, realizando as contagens do número de conídios em microscópio óptico, com o auxílio de câmara de Neubauer.

A viabilidade dos conídios foi avaliada, por meio da técnica de microcultivo, contando-se conídios germinados e não germinados, estabelecendo a porcentagem de germinação. Cada lâmina corresponde a uma repetição, confeccionando-se três lâminas.

Para a avaliação da viabilidade e crescimento vegetativo, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e para a avaliação da conidiogênese as médias foram comparadas pelo teste não paramétrico de Nemenyi a 5% de probabilidade.

Também foi calculado o valor corrigido do crescimento vegetativo e esporulação para a classificação da toxicidade de agrotóxicos para fungos entomopatogênicos que permite a classificação dos produtos em como muito tóxico (0 a 30), tóxico (31 a 45), moderadamente tóxico (46 a 60) ou compatível (> 60) (ALVES et al.,1998). O cálculo do valor T será realizado através da fórmula:

$$T = 20[CV] + 80[ESP] / 100$$

Onde:

T = valor corrigido do crescimento vegetativo e esporulação para classificação do produto.

CV = porcentagem de crescimento vegetativo com relação à testemunha.

ESP = porcentagem de esporulação com relação à testemunha.

A partir dos valores de T , o produto químico foi classificado como **muito tóxico** (0 a 30), **tóxico** (31 a 45), **moderadamente tóxico** (46 a 60) ou **compatível** (> 60) (ALVES et al., 1998).

A metodologia proposta por Alves et al. (1998) é a mais utilizada in vitro e tem sido adotada em muitos experimentos, principalmente no Brasil (ALVES, 1998; BATISTA FILHO et al., 2001)

4.8. Avaliação do potencial de infecção em mudas de café

Os isolados selecionados foram inoculados por meio de pulverização em 5 mudas de café por tratamento, utilizando uma suspensão de 10 ml com 1×10^8 conídios ml^{-1} conídios e uma controle, onde foi utilizado água destilada. Estas, foram mantidas em gaiolas dentro de sala climatizada a 25°C e fotofase de 12 horas. Foi retirada 1 folha de cada muda que foram submetidas ao processo de esterilização superficial descrito por Araújo *et al.* (2002), com detergente e água corrente e depois a esterilização profunda, com emersão em álcool por 3 minutos, HCl 2% por 10 minutos, novamente álcool por 1 minuto e água destilada autoclavada por 1 minuto duas vezes.

Após a desinfecção, essas folhas foram depositadas em placas contendo meio de cultura BDA e incubadas por 7 dias em BOD a 25°C. Este processo se repetiu antes e depois da inoculação, a fim de estabelecer uma comparação entre fungos endofíticos pré-existentes e os inoculados.

5. RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento de fungos endofíticos e variabilidade de morfoespécies

Foram isolados 101 fungos endofíticos de quatro propriedades localizadas no circuito de águas paulista e mogiana em Itapira (Tabela 3), (Figura 12), Águas de Lindoia (Tabela 4), (Figura 13), Socorro (Tabela 5), (Figura 14) e Serra Negra (Tabela 6), (Figura 15) em dezembro de 2019.

Utilizou-se o conceito de classificação de morfoespécies para análise macroscópica de Souza, (2019) para classificar fungos endofíticos de cafeeiro.

TABELA 3. Tabela de classificação de morfoespécies, utilizando o método de para classificação de fungos endofíticos do cafeeiro isolados de folhas, caules e raízes provenientes da propriedade de Itapira. Foram analisados coloração (frente e verso) da colônia, tipo de textura, topografia e borda descritos nos métodos de Carvalho & Pereira (2016).

Morfoespécie	Cor (frente e verso)	Textura	Topografia	Borda
1M1FS	Branco	algodonosa	lisa	Lisa
2M3FS	acinzentado	aveludada	lisa	Lisa
3M2FL	Laranja/cinza	granular	Lisa	Lisa
4M3FS	preto	granular	rugosa	Irregular
5M3CO	marrom	aveludada	lisa	Lisa
6M	branco	granular	rugosa	Muito irregular
7M4FO	preto	aveludada	verrucosa	Irregular
8M5FS	cinza claro	aveludada	lisa	Lisa
9M4FN	Cinza escuro	granular	rugosa	Lisa
10M2FL	Preto/cinza	aveludado	granular	Lisa
11MF1L	preto/laranja	granular	rugosa	Lisa
12M2CL	branco	aveludada	lisa	Lisa
13M4FL	branco/marrom	granular	Verrucosa	Irregular
14M2RN	branco/alaranjado	aveludada	lisa	Lisa
17M4CO	Preto	granular	verrucosa	Lisa
18M5FS	Marrom mesclado/cinza claro	Algodonosa	lisa	Lisa
19M3CO	Marrom	aveludada	rugosa	Lisa
21M5CL	cinza claro	granular	verrucosa	Lisa
22M3CO	Marrom escuro	granular	verrucosa	Lisa
23M5CN	Laranja e marrom	aveludada	lisa	Lisa
24M3CN	Cinza	aveludada	lisa	Lisa
25M5CS	branco/marrom	granular	granular	Irregular
26M1CO	branco/alaranjado	aveludada	lisa	Muito Irregular
27M3CO	Marrom	aveludada	rugosa	Lisa
29M2CN	Branco	aveludada	granular	Lisa
30M5CN	Cinza claro/alaranjado	aveludada	lisa	Lisa
31M2CL	Cinza claro/cinza escuro	aveludada	lisa	Lisa
32M2CN	Branco	aveludada	granular	Lisa
33M5CN	Laranja escuro	aveludada	granular	Lisa
36M4CN	Branco	aveludada	lisa	Irregular
37M2CS	cinza/Laranja	aveludada	granular	Lisa
38M2CL	Rosa	aveludada	lisa	lisa
40M1CL	Cinza	aveludada	lisa	Lisa

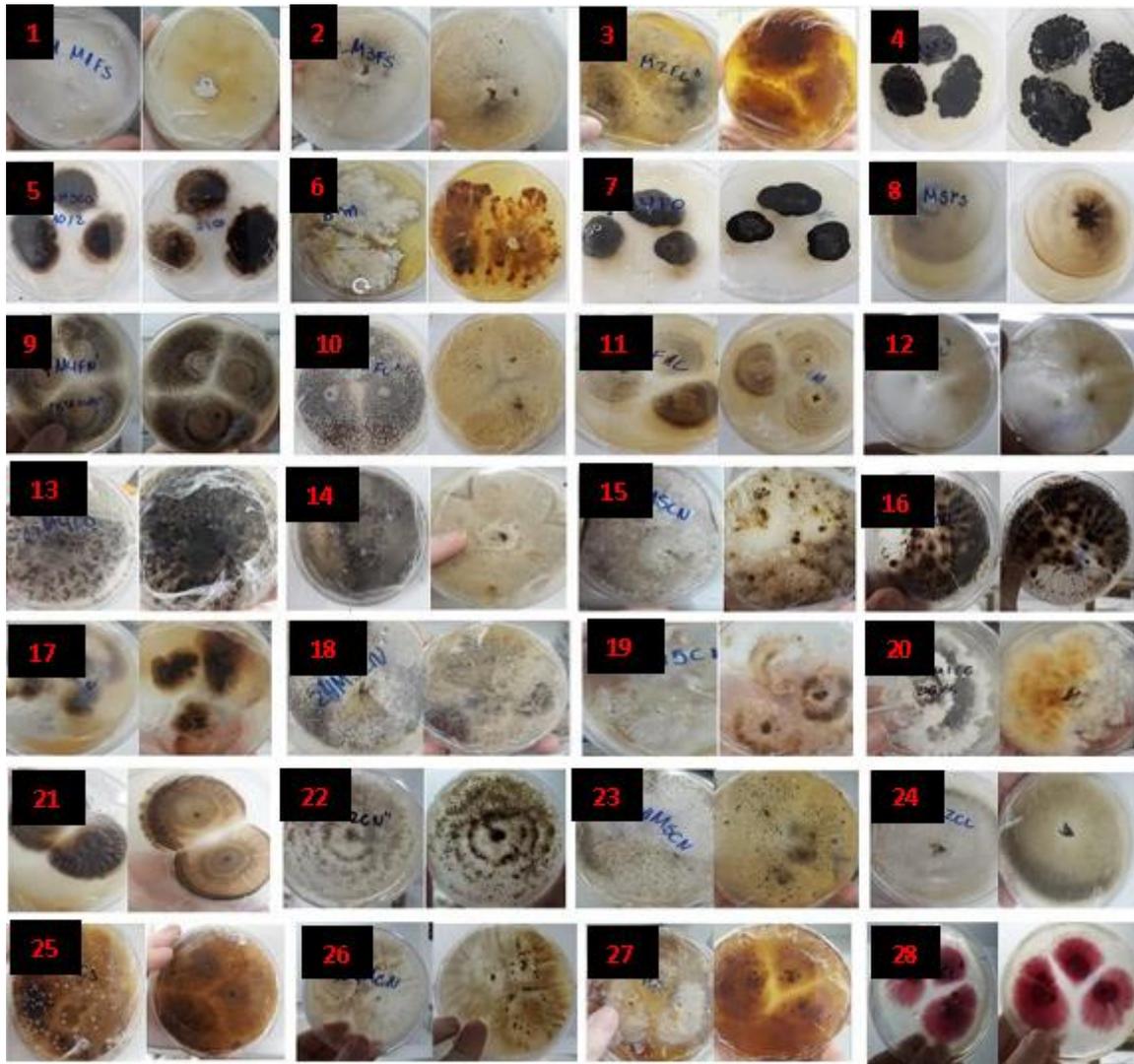


FIGURA 12. Morfoespécies (frente e verso) encontradas em tecidos vegetais de cafeeiro da cidade de Itapira - SP, isoladas no laboratório de controle biológico do Instituto Biológico de Campinas- SP, em novembro de 2019. (listados na tabela 3).

TABELA 4 - Fungos endofíticos do cafeeiro isolados de folhas, caules e raízes provenientes da propriedade de Águas de Lindoia. Analisando-se coloração (frente e verso) da colônia, tipo de textura, topografia e borda, descritos nos métodos de Carvalho & Pereira (2016), para identificação de morfoespécies.

Morfoespécie	Cor (frente e verso)	Textura	Topografia	Borda
1RCN	marrom escuro	granular	rugosa	irregular
2RCL	verde escuro	algodonosa	lisa	lisa
3RCL	laranja	aveludada	lisa	lisa
4R5CN	laranja	aveludada	lisa	lisa
5RCN	cinza/branco	aveludada	lisa	lisa
6RCN	branco	granular	rugosa	lisa
7RCS	marrom	aveludada	rugosa	lisa
8R1CS	cinza/creme	aveludada	rugosa	irregular
9RR5S	cinza	granular	rugosa	lisa
10RR5S	branco/vinho	algodonosa	lisa	Lisa
11RR3N	branco/roxo	aveludado	rugosa	lisa
12RFS	marrom/creme	granular	rugosa	irregular
13RFN	cinza/avermelhado	granular	verrucosa	lisa
14RNFN	Preto	Granular	Verrucosa	Muito irregular
15R5FL	Branco	Granular	Verrucosa	irregular

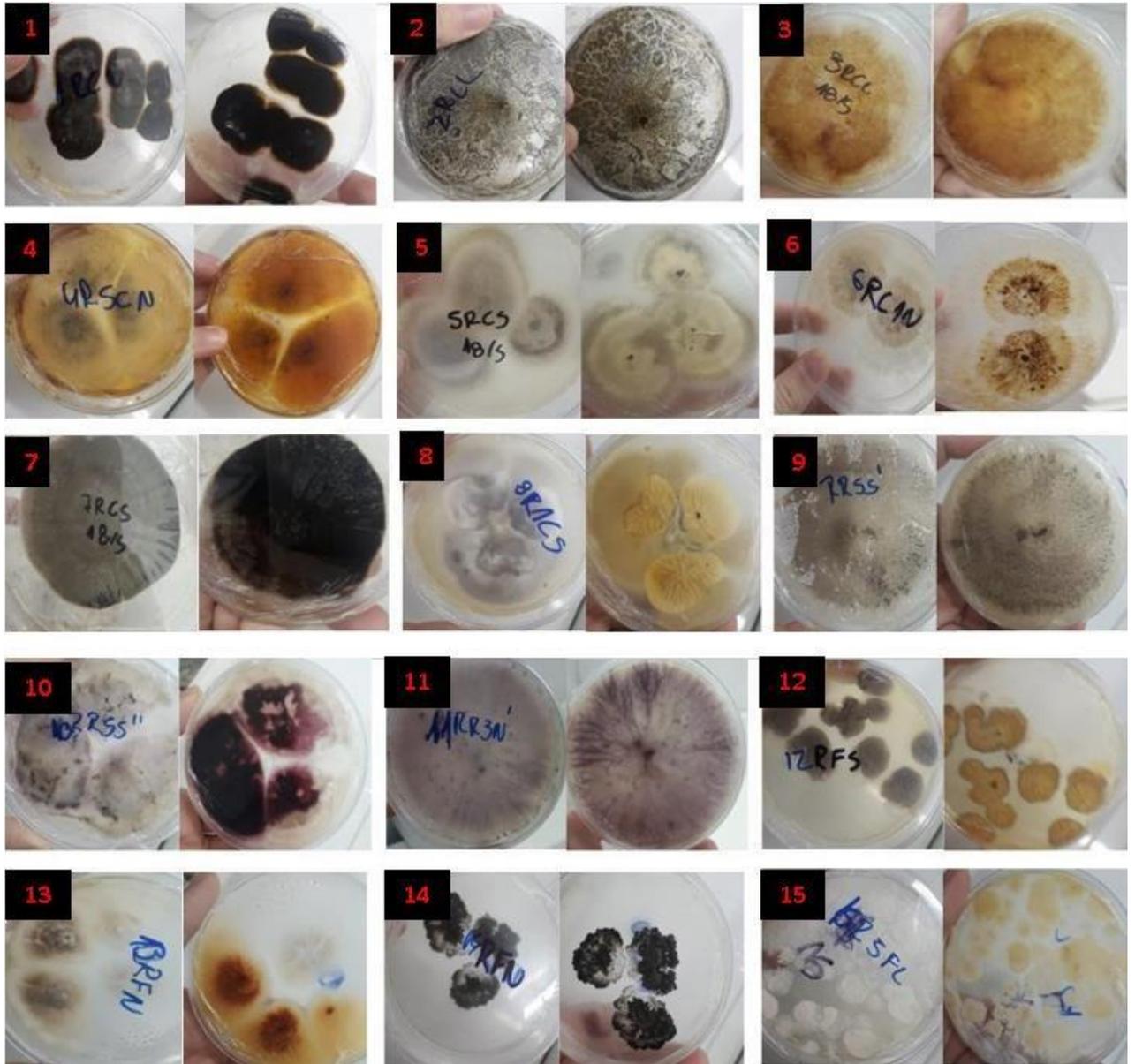


FIGURA 13. Morfoespécies (frente e verso) encontradas em tecidos vegetais de cafeeiro da cidade de Águas de Lindoia -SP, isoladas no laboratório de controle biológico do Instituto Biológico de Campinas- SP, em novembro de 2019. (listados na tabela 4). 7,11 E 15 foram identificadas molecularmente como *Bipolaris gossypina*, *Fusarium oxysporum* e *Beauveria bassiana* respectivamente.

TABELA 5- Fungos endofíticos do cafeeiro isolados de folhas, caules e raízes provenientes da propriedade de Socorro- SP. Analisando-se coloração (frente e verso) da colônia, tipo de textura, topografia e borda, descritos nos métodos de Carvalho & Pereira (2016), para identificação de morfoespécies.

Morfoespécie	Cor (frente e verso)	Textura	Topografia	Borda	Morfoespécie
1E3FN	Cinza	aveludada	rugosa	lisa	
2E4FS	branco/laranja	aveludada	umbilicada	lisa	
3E2FL	cinza/laranja	granular	rugosa	lisa	
4E1FN	preto/cinza	algodonosa	lisa	lisa	
5E3FL	marrom	aveludada	lisa	Muito irregular	
6ER1N	Cinza/Creme	Aveludada	Lisa	irregular	
7E4FS	Branco/creme	Aveludada	Lisa	lisa	
8ESFL	Cinza escuro/Preto	Granular	Umbilicado	irregular	
9E5CN	Marrom	Granular	Rugosa	lisa	
12E5CL	Alaranjado	Granular	Rugosa	lisa	
13E4CN	Marrom/Esverdeado	Granular	Rugoso	lisa	
14ER1L	Lilás/Roxo	Aveludado	Lisa	lisa	
15E2RO	Branco/Alaranjado	Aveludada	Lisa	lisa	
17ER2N	Marrom/Avermelhado	Aveludada	Rugosa	lisa	
18E1CO	Marrom	Aveludada	Lisa	lisa	
19E2CS	Branco/Alaranjado	Granular	Rugosa	Lisa	
20E2CN	Cinza alaranjado	Aveludado	Lisa	Lisa	
21E2CN	Branco	Granular	Lisa	Lisa	

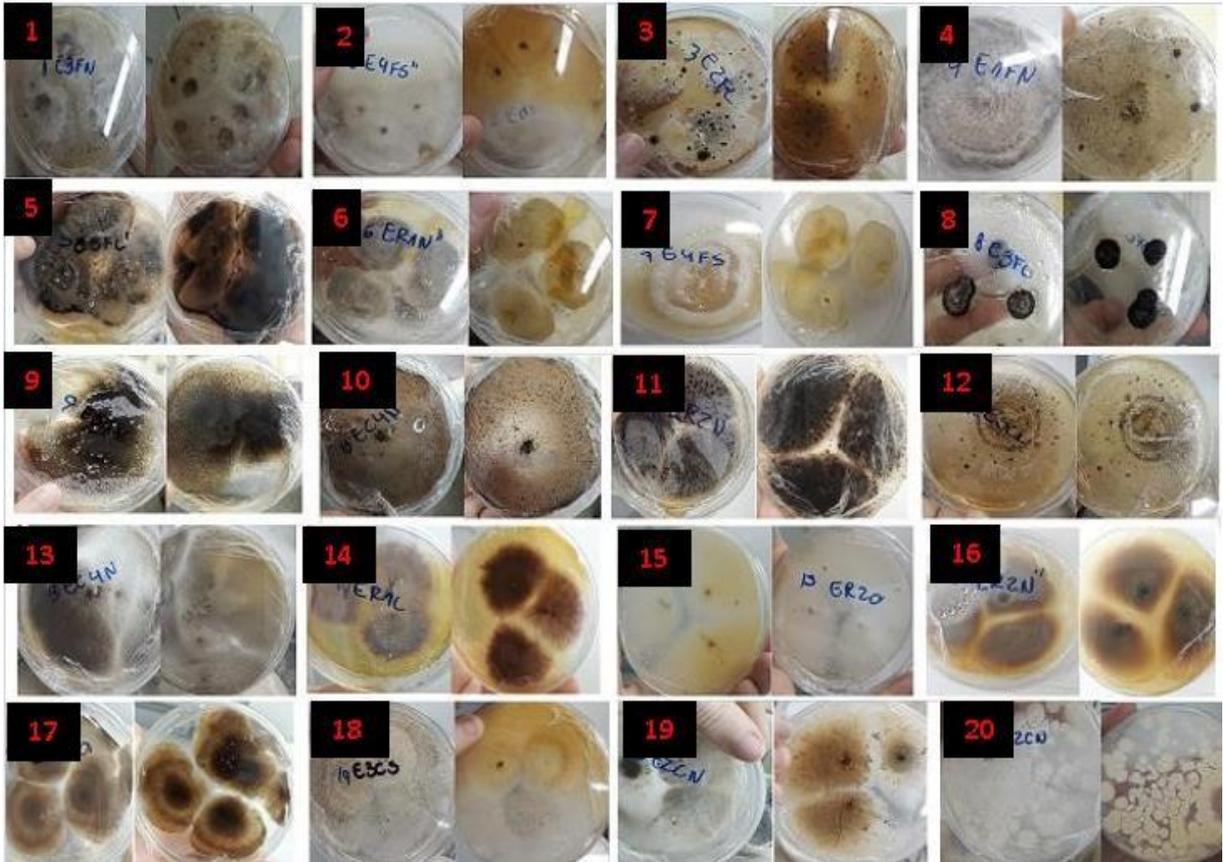


FIGURA 14. Morfoespécies (frente e verso) encontradas em tecidos vegetais de cafeeiro da cidade de Águas de Socorro -SP, isoladas no laboratório de controle biológico do Instituto Biológico de Campinas- SP, em novembro de 2019. (listados na tabela 4).

TABELA 6. Fungos endofíticos do cafeeiro isolados de folhas, caules e raízes provenientes da propriedade de Serra Negra, São Paulo. Analisando-se coloração (frente e verso) da colônia, tipo de textura, topografia e borda, descritos nos métodos de Carvalho & Pereira (2016), para identificação de morfoespécies.

Morfoespécie	Cor (frente e verso)	Textura	Topografia	Borda
1S4CL	Branco	Granular	Rugosa	irregular
2S4CS	marrom escuro	Aveludada	Lisa	lisa
3S5CO	branco	Granular	Rugosa	lisa
4S4CS	branco/salmao	Aveludada	Lisa	lisa
5S5CL	Marrom escuro	Aveludada	Lisa	lisa
6S4CL	Cinza esverdeado	Algodonosa	Lisa	lisa
7S4CS	Marrom escuro	Algodonosa	Lisa	lisa
8S3CL	Verde escuro	Aveludada	Lisa	lisa
9S5CL	Branco	Algodonosa	Lisa	lisa
10S5CO	cinza/amarronzado	Granular	Rugosa	lisa
11S5CO	Branco/Marrom	Aveludada	Lisa	lisa
12S3CN	branco/cinza	Aveludada	Lisa	lisa
13S4CS	branca/marrom	Aveludada	Lisa	lisa
15S5CO	Branco/Avermelhado	Granular	Rugosa	lisa
16S5FS	branco/marrom	Aveludada	Lisa	lisa
17S4FO	Preto	Granular	Lisa	lisa
19S4FS	Branco	Algodonosa	Lisa	lisa
20S3FS	Branco	Granular	Lisa	lisa
23S5CS	Branco	Aveludada	Lisa	lisa
24S5FS	Predo/Mesclado	Algodonosa	Lisa	lisa
25SF3SO	Branco	Granular	Lisa	lisa
26S4FS	Branco/salmao	Lisa	Lisa	irregular

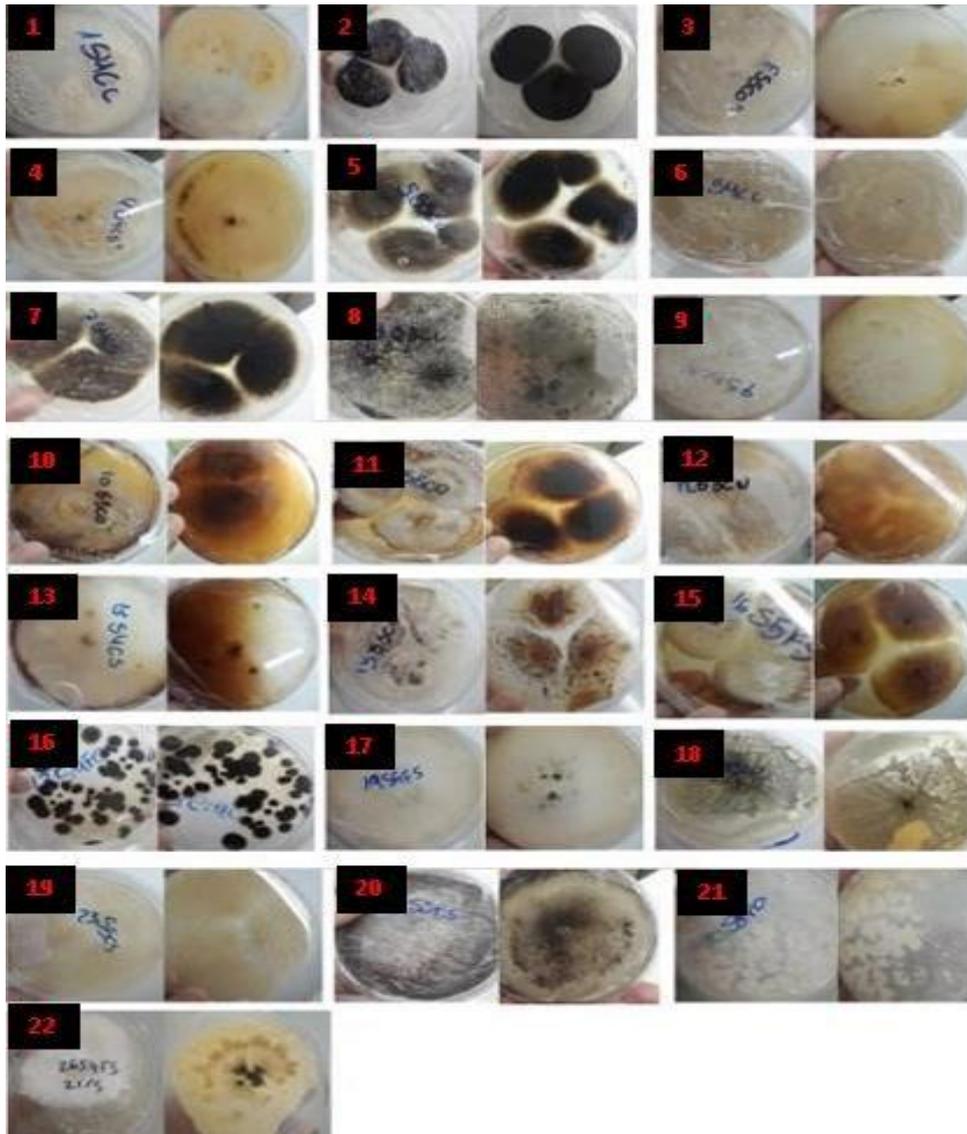


FIGURA 15. Morfoespécies (frente e verso) encontradas em tecidos vegetais de cafeeiro da cidade de Serra Negra -SP, isoladas no laboratório de controle biológico do Instituto Biológico de Campinas- SP, em novembro de 2019. (listados na tabela 6).

A classificação de morfoespécies, permitiu o agrupamento de isolados em 12 principais grupos predominantes (Tabela 7). As morfologias mais comuns, foram isolados com textura algodonosa, topografia lisa e borda lisa nos (fungos de coloração branca, cinza e marrom) e textura aveludada, topografia lisa e borda lisa, (nos fungos de coloração branca, preta laranja, rosa, verde e lilás).

TABELA 7. Grupos de características predominantes de fungos endofíticos isolados de cafeeiros, criados a partir da observação macroscópica de características dos isolados de folhas de café, descritos nos métodos de Carvalho & Pereira (2016) para identificação de morfoespécies.

Grupo	Coloração	Morfologia da colônia (Textura/topografia/borda)	%
I	Branco	Algodonosa/Lisa/Lisa	31,25
II	Branco	Aveludada/lisa/lisa	28,12
III	Cinza	Algodonosa/Lisa/Lisa	27,27
IV	Cinza	Granular/Verrucosa/Lisa	36,36
V	Preto	Granular/Verrucosa/Irregular	33,33
VI	Preto	Aveludada/umbilicada/lisa	33,33
VII	Marrom	Algodonosa/Lisa/Lisa	31,25
VIII	Marrom	Granular/Verrucosa/Lisa	31,25
IX	Laranja	Aveludada/lisa/lisa	75
X	Rosa	Aveludada/Lisa/Irregular	100
XI	Verde	Aveludada/lisa/lisa	100
XII	Lilás	Aveludada/lisa/lisa	100

5.2. Variabilidade de morfoespécies fúngicas

De acordo com a análise de dados, das 4 propriedades avaliadas, a propriedade de Itapira, apresentou maior variabilidade fúngica em comparação com as outras 3. Seguido da propriedade da cidade de Serra Negra, Socorro e Águas de Lindoia, respectivamente (Figura 16).

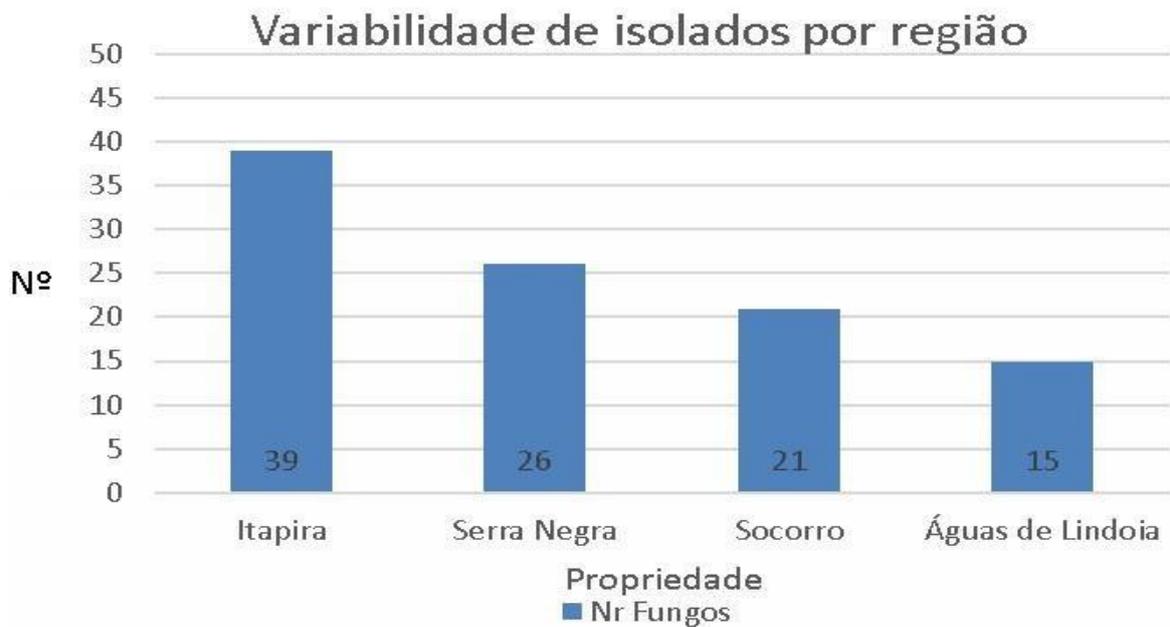


FIGURA 16. Número total de fungos endofíticos isolados de cafeeiros por propriedade (Itapira, Serra Negra, Socorro e Águas de Lindoia no estado de São Paulo) em novembro de 2019.

Já em relação a orientação geográfica, houve uma diferença expressiva na quantidade de fungos isolados. As posições “Norte” e “Sul” obtiveram maior diversidade, com 33 e 31 isolados, respectivamente. Já a posição Leste e Oeste, tiveram 19 e 18 fungos respectivamente (Figura 17).

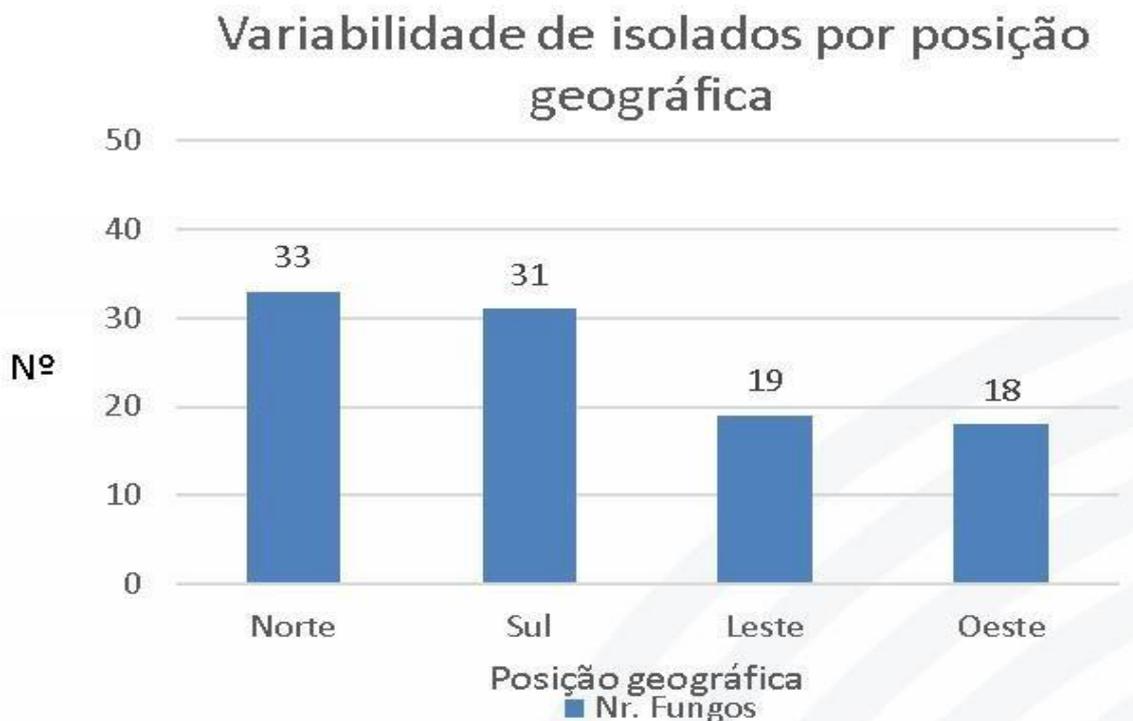


FIGURA 17. Número total de fungos endofíticos isolados de cafeeiros por posição geográfica (Norte, sul, leste e oeste) de tecidos vegetais de cafeeiros localizados em Águas de Lindoia, Socorro, Serra Negra e Itapira, do estado de São Paulo em novembro de 2019.

Da mesma forma, observou-se maior variabilidade de morfoespécies relacionadas a região do caule, com variabilidade significativa, (52,48%) quando comparados a folhas e raízes, com 36% e 12% respectivamente, constatado no gráfico abaixo (Figura 18).

Estes resultados coincidem com o trabalho realizado por Monteiro (2016), que isolou maior variabilidade de fungos em caules seguido de folhas de plantas de café. Porém, o autor não cita o isolamento em raízes.

No trabalho realizado por Vieira (2010) com extração de fungos endofíticos em algodoeiro, constatou-se menor variabilidade fúngica em raízes, quando comparado a folhas e caules.

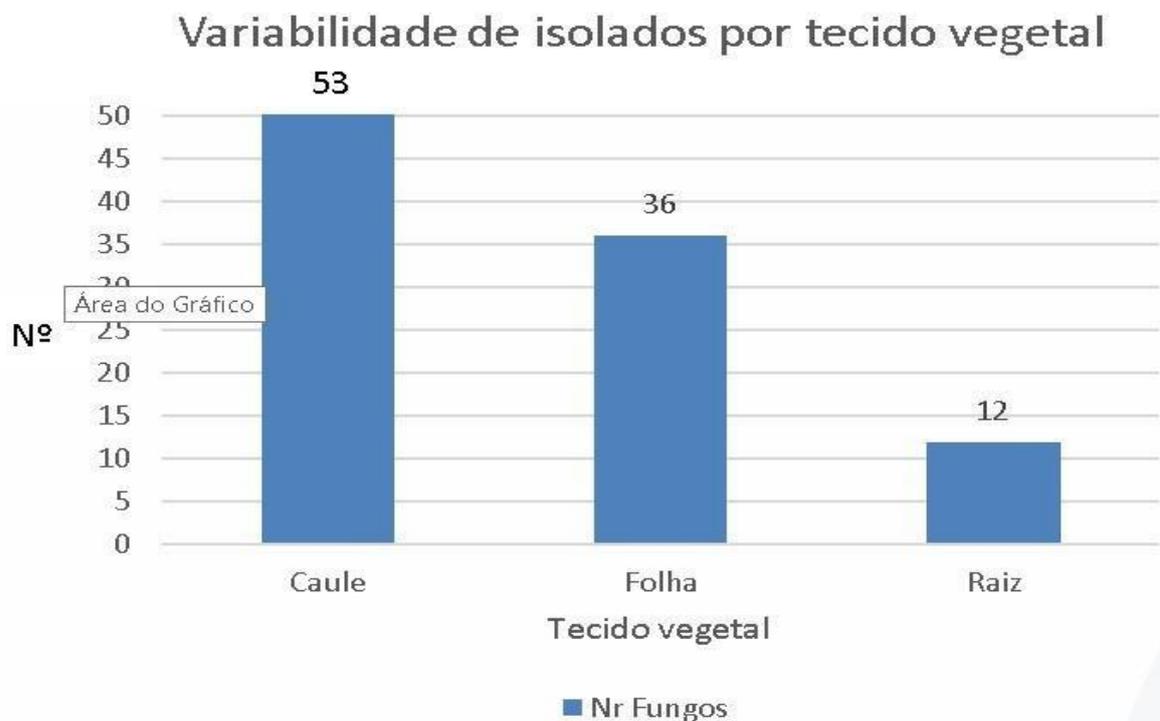


FIGURA 18. Número total de fungos endofíticos isolados por tecido vegetal (caules, folha e raízes de cafeeiros) das propriedades de Águas de Lindóia, Socorro, Serra Negra e Itapira do estado de São Paulo em outubro de 2019.

5.3. Teste de entomopatogenicidade em larvas de *G. mellonella*

Ao todo, foram testados 101 fungos em larvas de *Galleria mellonella*, para selecionar os fungos de maior potencial patogênico. Destes, 18 apresentaram patogenicidade (Tabela 8) (Figuras 19 e 20).

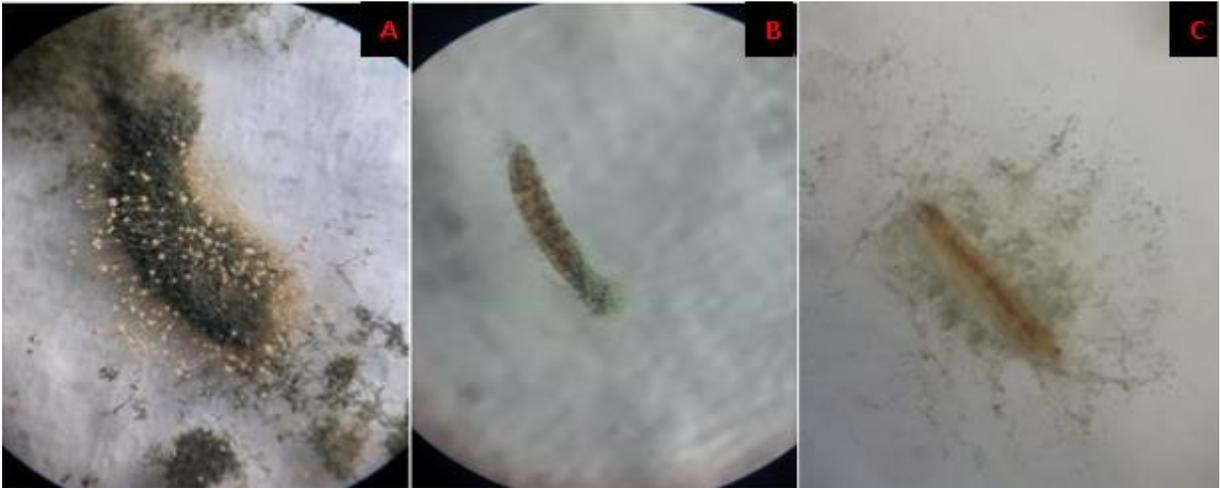


FIGURA 19. Larvas de *Galleria mellonella* inoculadas no teste de entomopatogenicidade realizado no laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas, em janeiro de 2020, onde: A- foi infectada com o fungo “8S” e B e C- com o fungo ‘20S”.

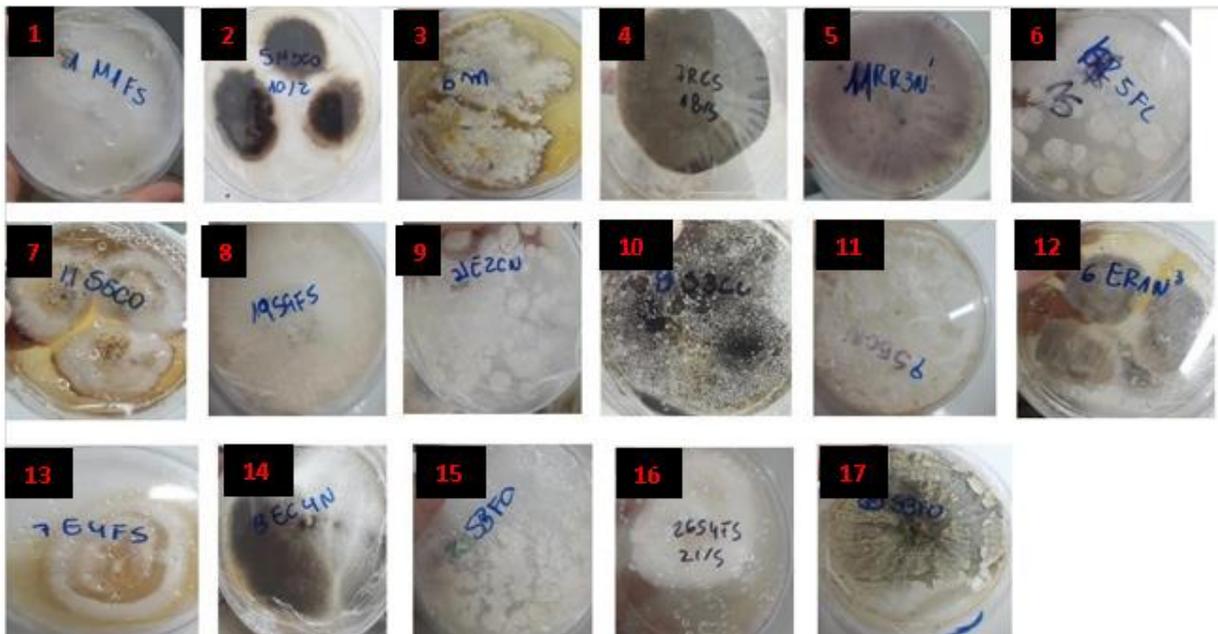


FIGURA 20. Isolados que demonstraram atividade entomopatogênica em *screening* com *G. mellonella*, posteriormente utilizados no teste de entomopatogenicidade sobre *L. coffeella*. 1- *Diatrypella vulgaris* 2- *Aspergillus clavatonanicus*, 3- *Diaporthe oxe*, 4- *Bipolaris glossypina*, 5- *Fusarium oxysporum*, 6- *Beauveria bassiana*, 7- *Diaporthe endophytica*, 8- *Diaporthe endophytica*, 9- *Beauveria bassiana*, 10- *Trichoderma asperellum*, 11- *Diaporthe endophytica*, 14- *Aspergillus fumigatus*, 15- *Beauveria bassiana*, 16- *Nemania difusa* e 17- *Trichoderma asperellum*.

TABELA 8. Número médio de *G. Mellonella* mortas/repetição e mortalidade total (%) aos 10 dias após a aplicação de suspensão de 1×10^8 conídios ml^{-1} , em função dos diferentes tratamentos.

Fungo	Média <i>G.mellonella</i> mortas/repetição	%MT - mortalidade total
1MFS	2.2	44
5MFS	1.6	32
6MFN	1.0	20
13MFO	1.4	28
1EFN	0.8	16
6ENR	1.0	20
7EFS	0.6	12
13ECN	2.0	40
21ECN	2.0	40
8SCL	1.0	20
9SCN	0.4	8
11SCO	1.0	20
19SFS	0.4	8
20SCO	1.4	28
25SFO	1.0	20
26SFN	1.0	20
15RFL	1.0	20
7RCS	0.6	12
Controle	0.3	5

A propriedade de Itapira foi a que apresentou maior número de isolados capazes de provocar mortalidade em larvas de *G. mellonella*, seguido da propriedade situada na região de Serra Negra, Socorro e Águas de Lindoia respectivamente. (Figura 21).

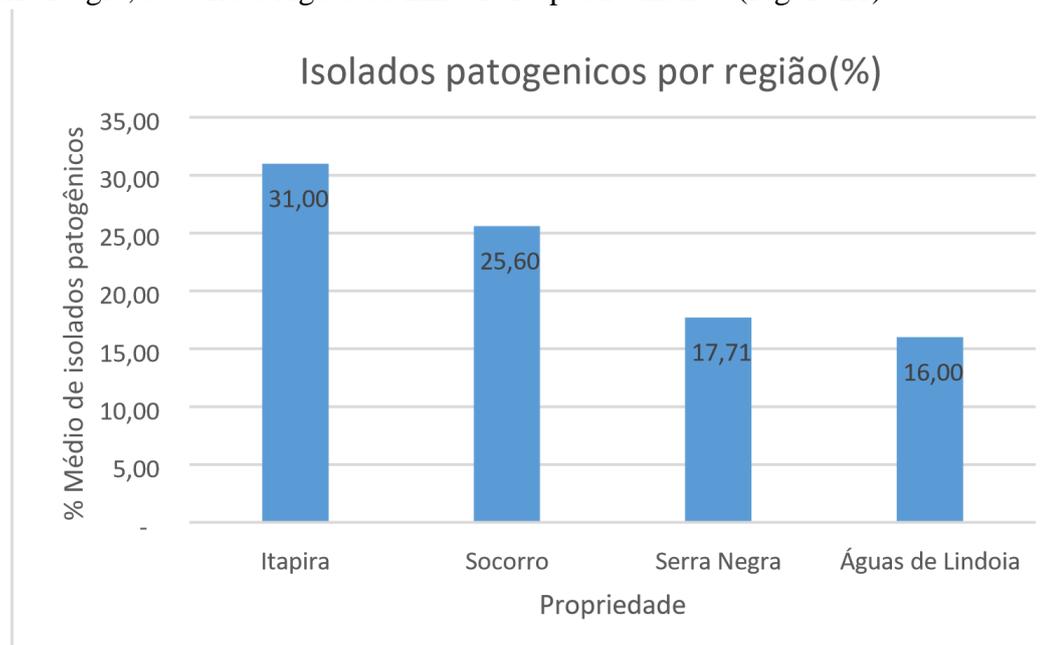


FIGURA 21. Gráfico representando a porcentagem de fungos entomopatogênicos para *G. mellonella* das regiões de Itapira, Socorro, Serra Negra e Águas de Lindoia no estado de São Paulo.

Já em relação a região da planta, os fungos provenientes da região do caule (24 morfoespécies patogênicas), apresentaram maior capacidade patogênica. Porém, sem diferença expressiva das outras regiões, como folha (22) e raiz (18) (Figura 22).

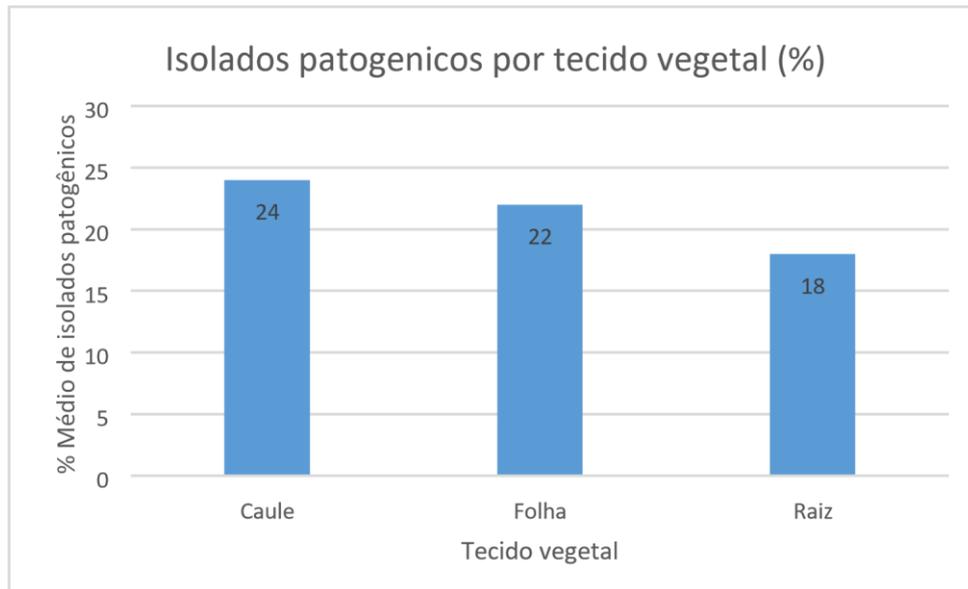


FIGURA 22. Porcentagem de fungos entomopatogênicos para *G. mellonella* existentes em amostras de caules, folhas e raízes de café extraídas das propriedades de Socorro, Águas de Lindóia, Serra Negra e Itapira.

Com relação a posição geográfica, os fungos da região Oeste, obtiveram maior índice de patogenicidade (24). Porém, não houve diferença expressiva quanto as outras regiões, como Norte (22,5), Sul (21,6) e leste (20). (Figura 23).

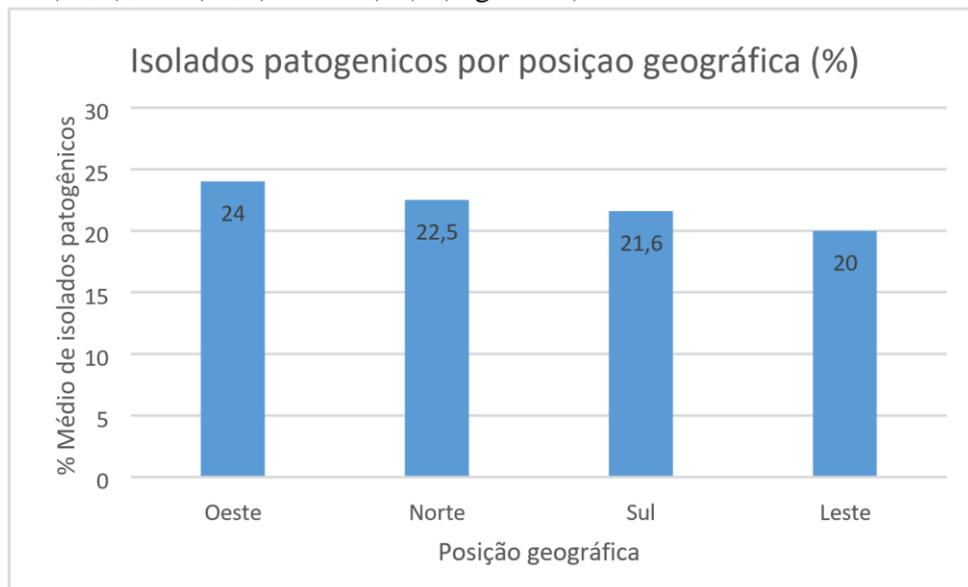


FIGURA 23. Gráfico representando a porcentagem de fungos entomopatogênicos para *G. mellonella* existentes em cafés nas posições cardais (Norte, sul, leste e oeste).

5.4. Identificação molecular

Os isolados selecionados no teste de entomopatogenicidade foram enviados para o Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Biológico de São Paulo, onde foram realizadas as identificações das amostras. (Tabela 9.)

Com os resultados obtidos, foi possível agrupar os fungos endofíticos em filo, classe e ordem. Todos os isolados pertencem ao filo Ascomycota. Também diferenciaram-se em 3 classes diferentes, onde a maioria pertence a classe Sordariomycetes (12 isolados), seguido da classe Eurotiomycetes (3 isolados) e da classe Dothideomycetes (1 isolado). E 5 ordens diferentes, onde a maioria pertence a ordem Hypocreales (8 isolados), seguido da ordem Eurotiales (3 isolados), Diaporthales (2 isolados) e Xylariales (2 isolados) e Pleosporales (1 isolado) (Tabela 03).

TABELA 9. Identificação molecular realizada no laboratório de biologia molecular do Instituto Biológico de São Paulo em 2021, de isolados endofíticos entomopatogênicos selecionados no screening com larvas de *G. mellonella*, posteriormente utilizados em teste de patogenicidade em *L. coffeella*

Fungo	Identificação	Origem	Filo	Classe	Ordem
5M	<i>Aspergillus clavatonanicus</i>	Folha - Itapira	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales
6M	<i>Diaporthe oxe</i>	Folha - Itapira	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales
32M	<i>Diatrypella vulgaris</i>	Folha - Itapira	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales
1E	<i>Fusarium oxysporum</i>	Folha - Socorro	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales
6E	<i>Aspergillus clavatonanicus</i>	Raiz - Socorro	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales
13E	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Caule - Socorro	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales
21E	<i>Beauveria bassiana</i>	Caule - Socorro	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales
2R	<i>Trichoderma asperellum</i>	Caule - Águas de Lindoia	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales
7R	<i>Bipolaris gossypina</i>	Caule - Águas de Lindoia	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales
11R	<i>Fusarium oxysporum</i>	Raíz - Águas de Lindoia	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales
15R	<i>Beauveria bassiana</i>	Folha - Águas de Lindoia	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales
8S	<i>Trichoderma asperellum</i>	Caule - Serra Negra	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales
19S	<i>Diaporthe endophytica</i>	Folha - Serra Negra	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales
20S	<i>Trichoderma asperellum</i>	Folha - Serra Negra	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales
25S	<i>Beauveria bassiana</i>	Folha - Serra Negra	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales
26S	<i>Nemania diffusa</i>	Folha - Serra Negra	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales

A espécie 13E (*Aspergillus fumigatus*) foi encontrado habitando de forma endofítica, sementes de café na Colômbia, Guatemala, Índia, Quênia, Papua Nova Guiné, Puerto Rico e Vietnã trabalho de Vega *et al.*, (2008).

5.5. Teste de interação com produtos fitossanitários

A conservação dos fungos endofíticos é considerada uma importante estratégia do MIP, fazendo-se importante a utilização de métodos complementares compatíveis com microorganismos benéficos. Essa interação é considerada benéfica, podendo ter efeito sinérgico de ambos os componentes, mas também pode ser negativa, quando ocorre a inibição de um dos componentes. Produtos fitossanitários, principalmente os fungicidas, geralmente inibem a fermentação de esporos, diminuindo o potencial do inoculo, fazendo-se importante a avaliação da conservação de viabilidade fúngica. (NEVES *et al.*, 2005).

B. bassiana também apresentou aumento do crescimento vegetativo quando em contato com Bravonil, com queda pouco expressiva no número de conídios em relação a testemunha. Actara não interferiu no crescimento vegetativo nem na conidiogênese, sendo semelhante estatisticamente ao controle

O autor Zimmerman (1975), constata que a inibição crescimento vegetativo por parte de um produto químico, não é necessariamente um indicativo de redução esporulação ou viabilidade dos conídios. Fato que corrobora com o desenvolvimento do isolado *B. bassiana* em contato com Emzeb, Amistar e Comet, *A. fumigatus* em contato com Amistar e *A. clavatonanicus* em contato com Actara e amistar, que tiveram seu crescimento vegetativo inibido, mas mantiveram a conidiogênese. (Tabela 10).

O oposto também foi observado, quando o fungo apresentou crescimento vegetativo igual ou maior ao controle, quando inoculado ao meio de cultura com produtos fitossanitários, mas com queda na conidiogênese. *B. bassiana* e *A. fumigatus* tiveram aumento do crescimento vegetativo em contato com Bravonil. Emzeb e Comet também tiveram o mesmo efeito em *A. fumigatus*. (Tabela 10)

Alguns fungos apresentaram maior produção de conídios quando em contato com produtos fitossanitários do que em relação ao controle, como *A. clavatonanicus*, que em contato com amistar, teve a conidiogênese elevada (Tabela 10). Na literatura, os autores Moino Jr. & Alves (1998). Sugerem que o fungo, frente a um composto tóxico que altere o seu ambiente, pode ser capaz de realizar um maior esforço reprodutivo que resulta em um aumento da conidiogênese.

O isolado 32M (*D. vulgaris*) teve seu crescimento vegetativo e esporulação totalmente afetado por todos os produtos testados, apresentando crescimento fúngico nulo em todas as repetições (Figura 24 e Tabela 10). Uma possível explicação para esses resultados é que ao metabolizar o meio contendo a formulação, o fungo pode gerar acúmulo de resíduos tóxicos, que bloqueiam vias de compostos importantes para o crescimento fúngico (OLIVEIRA et al. 2002).

TABELA 10. Tabela de viabilidade de conídios e diâmetro do crescimento vegetativo e conidiogênese de fungos endofíticos, entomopatogênicos para *L. coffeella* em interação com produtos fitossanitários, realizado no laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas em 2021.

21E			13E			
Tratamento	Crescimento vegetativo (cm)	Número de conídios ($10^8 \cdot \text{ml}^{-1}$)	Viabilidade (%)	Crescimento vegetativo (cm)	Número de conídios ($10^8 \cdot \text{ml}^{-1}$)	Viabilidade (%)
Bravonil	2,25	116,67 ^b	84,5 ^a	3,5	217,00 ^{ab}	94,1 ^a
Actara	1,5	193,00 ^a	94,6 ^{ac}	2,5	258,67 ^a	91,2 ^a
Cercobin	-	- ^c	- ^d	2,5	114,67 ^c	75,5 ^b
Emzeb	1,25	95,00 ^f	19,6 ^d	3,5	115,67 ^c	81,5 ^b
Amistar	1,25	198,67 ^a	83,2 ^{ab}	1,75	299,67 ^a	95,6 ^a
Comet	0,75	54,67 ^d	73,1 ^b	3,5	91,33 ^c	57,2 ^c
Controle	1,5	273,00 ^e	99,2 ^c	2,5	322,67 ^d	98,5 ^a
5M			32M			
Tratamento	Crescimento vegetativo (cm)	Número de conídios ($10^8 \cdot \text{ml}^{-1}$)	Viabilidade (%)	Crescimento vegetativo (cm)	Número de conídios ($10^8 \cdot \text{ml}^{-1}$)	Viabilidade (%)
Bravonil	0	0 ^c	- ^c	-	-	-
Actara	1,75	137,33 ^a	93,5 ^b	-	-	-
Cercobin	0	0 ^c	- ^c	-	-	-
Emzeb	0	0 ^c	- ^c	-	-	-
Amistar	1,75	206,33 ^b	95,1 ^b	-	-	-
Comet	0	0 ^c	- ^c	-	-	-
Controle	4,25	189 ^b	99,6 ^a	4,5	100,67 ^a	98,0 ^a

*média de crescimento vegetativo avaliando 3 repetições, **média de conídios germinados avaliando 3 repetições

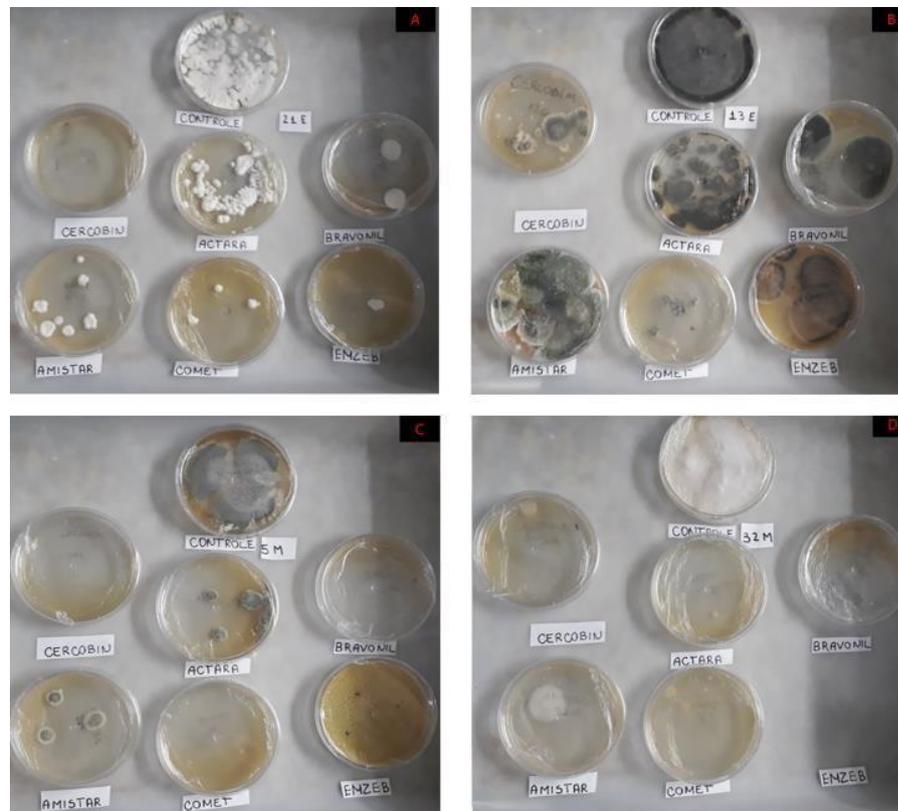


FIGURA 24. Ação de produtos fitossanitários (Bravonil, Amistar, Actara, Emzeb e Comet) sobre o crescimento vegetativo de colônias de fungos endofíticos entomopatogênicos do cafeeiro após sete dias, em relação à testemunha, onde; A- *B. bassiana*, B- Fungo *A. fumigatus*, C- Fungo *A. clavatonanicus* e D- Fungo *Diatrypella Vulgaris*.

Com relação ao grau de toxicidade dos produtos fitossanitários testados (Tabela 11), verifica-se que o isolado 13E (*A. fumigatus*) foi compatível com todos os produtos testados, com exceção do Comet, que foi considerado muito tóxico.

Com relação ao fungo 21E (*B. bassiana*), houve compatibilidade com todos os produtos testados, com exceção do Emzeb, considerado moderadamente tóxico, cercobin e comet, que se mostrou muito tóxico (Tabela 11).

Estes resultados são semelhantes nos trabalhos de Soares (2011) que mostraram que os fungicidas Emzeb e Comet apesar de se mostrarem tóxicos para *B. bassiana*, não inibiram completamente a germinação dos conídios. Porém, difere-se quanto ao produto Cercobin, que foi considerado tóxico com algum grau de germinação e no presente trabalho, houve inibição total de crescimento micelial e conidiogênese (Tabela 10).

Já o fungo 5M (*A. clavatonanicus*) foi considerado compatível apenas com o produto Actara e Amistar (Tabela 11).

TABELA 11. - Classificação da toxicidade dos produtos fitossanitários aos isolados de fungos selecionados para controle de *Leucoptera coffeella*, de acordo com o método proposto por Alves *et al.*, 1998).

Fungo	Tratamento	Valor T*	Compatibilidade
13E	Bravonil	76,36	Compatível
	Actara	75,68	Compatível
	Cercobin	60,63	Compatível
	Emzeb	62,29	Compatível
	Amistar	82,35	Compatível
	Comet	26,58	Muito tóxico
21E	Bravonil	63,36	Compatível
	Actara	77,86	Compatível
	Cercobin		- Muito tóxico
	Emzeb	37,82	Moderadamente tóxico
	Amistar	70,79	Compatível
	Comet	26,53	Muito tóxico
32M	Bravonil	-	Tóxico
	Actara	-	Tóxico
	Cercobin	-	Tóxico
	Emzeb	-	Tóxico
	Amistar	-	Tóxico
	Comet	-	Tóxico
5M	Bravonil	-	Tóxico
	Actara	66,37	Compatível
	Cercobin	-	Tóxico
	Emzeb	-	Tóxico
	Amistar	95,57	Compatível
	Comet	-	Tóxico

*Valor T = valor corrigido do crescimento vegetativo e esporulação para classificação do produto

5.6. Teste de entomopatogenicidade em larvas de *L.coffeella*

As lagartas infectadas apresentavam mudança de coloração, fina camada de micélio ao redor do corpo, e em alguns casos, ressecamento do tegumento. Também foi observado a infecção de pupas pelos fungos inoculados, onde apresentavam casuloso incompletos (fina camada de seda sob o cadáver) e casulos parcialmente ou totalmente tomados por micélio. Após 15 dias de observação, foi constatado que os fungos IBCB130 (*I. fumorosea*) 21E (*B. bassiana*) e 5M (*A. clavatonanicus*) apresentaram maior taxa de mortalidade sobre *L. coffeella* ao longo de 15 dias de observação, com 70,86%, 63,59% e 52,34% de mortalidade respectivamente, sendo que estes 3 não diferem estatisticamente entre si.

Estes resultados são compatíveis com os estudos de Draganova & Tomov (1998), onde a espécie *B. bassiana* também foi descrita como patogênica à *Leucoptera*

malifoliella, infectando as larvas do último instar no momento que elas deixam as minas para formação das pupas.

A mortalidade causadas pelos isolados IBCB130 (*I. fumorosea*) 21E (*B.bassiana*) foram os que mais se aproximaram da eficácia de produtos químicos recomendadas ao combate de *L.coffeella*, visto que no trabalho de Zampiroli., (2016) o inseticida Altacor alcançou 87,5% de mortalidade e nos trabalhos de Melo., (2017), os inseticidas clorantraniliprole e cloridrato de cartape causaram 82,7% e 86,0% de mortalidade em condições de aplicação específicas.

O desempenho do isolado 5M (*Aspergillus clavatonanicus*) provocou 50% de mortalidade, semelhante aos resultados de 2 isolados do gênero *Aspergillus* descritos nos trabalhos de Amatuzzi., (2014), causaram 54%-56% de mortalidade sobre a praga de morangueiro *Diatrea. fovealis*. Embora a espécie *A. clavatonanicus* ainda não tenha sido descrita na literatura como isolado de potencial entomopatogênico. Contudo, existem citações na literatura médica sobre seu potencial patogênico em humanos.

Já os fungos 13E (*Aspergillus fumigatus*), IBCB425 (*Metarhizium anisopliae*) e 32M (*Diatrypella vulgaris*) causaram mortalidade de 46,68%, 19,11% e 14,19% respectivamente. Estes números diferem estatisticamente entre si. Contudo, a mortalidade de *D. vulgaris* foi estatisticamente igual ao controle.

De modo geral, a mortalidades observada em indivíduos de *L.coffeella* foram mais significativas (46,68%, -70,86%,) do que no controle (11,09 %), diferindo-se estatisticamente, com exceção do isolado 32M (*D. vulgaris*) que igualou-se estatisticamente ao controle (Tabela 12).

Segundo Penna *et al.*, (2012) o isolado IBCB425 de *M.anisopliae* é o mais utilizado no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Cigarrinhada-raiz) por biofábricas brasileiras e usinas sucroalcooleiras. Por isso os autores o testaram como isolado padrão no controle *Diatraea saccharalis*, mas o mesmo causou apenas 37,5% de mortalidade. Ainda, segundo outro autor, diversos isolados de *Metarhizium anisopliae* se mostraram patogênico a ovos e lagartas de *L. coffeella*, alcançando 100% de mortalidade em todos os casos. (APUD; VILLACORTA, 1983).

TABELA 12. – Mortalidade (%) de fungos endofíticos de cafeeiro sobre *L.coffeella* por repetição durante 15 dias de observação após a inoculação.

Isolado	1	2	3	4	5	Testemunha	Média (MT)*	Des.Pad **	EM* **
IBCB130	75,00	66,67	93,33	52,63	66,67	20%	70,86 ^a	13,34	5,97
<i>B. bassiana</i>	55,56	60,00	66,67	50,00	85,71	22,2%	63,59 ^a	12,34	5,52
<i>A clavatonanicus</i>	66,67	85,71	30,77	42,86	35,71	12,5%	52,34 ^a	20,74	9,28
<i>A. fumigatus</i>	62,50	45,45	45,45	30,00	50,00	16,67%	46,68 ^{ab}	10,42	4,66
IBCB425	33,33	-	20,00	20,00	22,22	-	19,11 ^{b c}	10,76	4,81
<i>D. vulgaris</i>	15,38	-	22,22	33,33	-	-	14,19 ^c	12,92	5,78
Testemunha	16,67	12,50	-	12,50	-	-	11,09 ^c	8,83	3,64

Letras iguais significam semelhança estatística.

*MT: Mortalidade total, **DesPad: Desvio padrão, ***EM: Erro padrão



FIGURA 25. Larvas e pupas de bicho-mineiro colonizadas com fungos entomopatogênicos, onde: A) Lagarta saudável. B) lagartas mortas com inoculação do isolado 13E (*A. fumigatus*) antes de expressar crescimento micelial no tegumento. C) lagarta morta com inoculação do isolado 13E colonizando o corpo do inseto. D) e E) Lagarta morta com o fungo 5M (*A.clavatonanicus*). F) e G) Lagartas colonizadas com o fungo IBCB130 (*C. fumosorosea*). H) Pupas saudáveis de *L.coffeella*. I), J) e K) Pupas mortas com a suspensão de IBCB130, apresentando o casulo colonizado por micélio e formação desorganizada. L) e M) Pupa e lagarta em processo de pupa colonizadas pelo fungo 5M e N) Comparação de uma pupa saudável com uma lagarta que morreu em meio ao processo de pupagem.

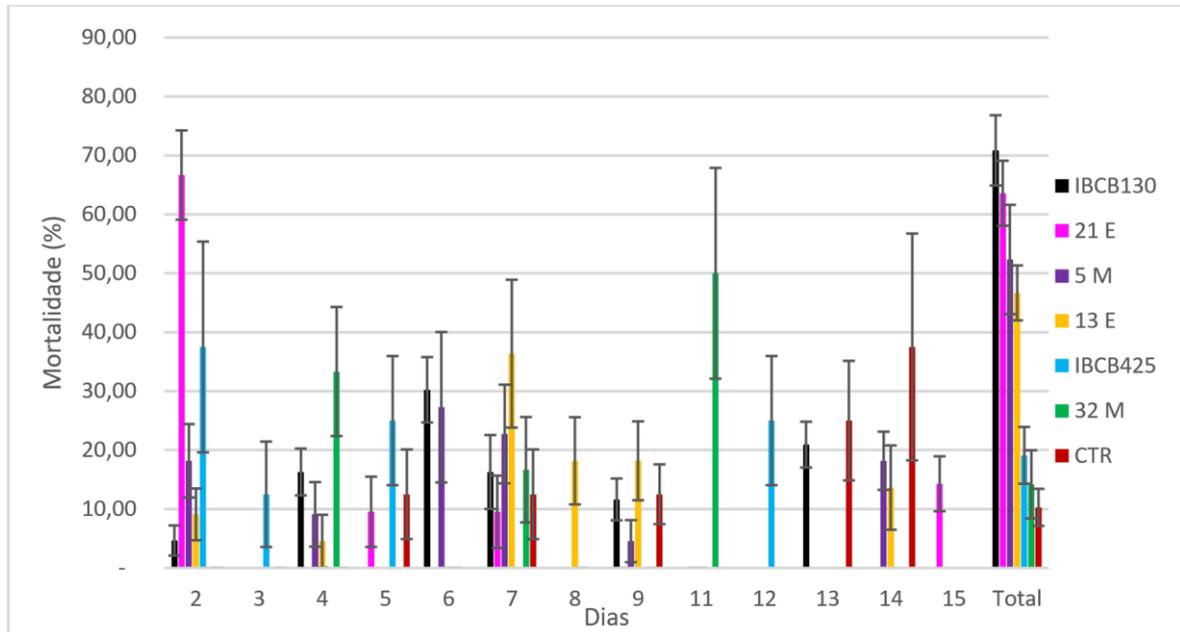


FIGURA 26. Gráfico da mortalidade de fungos endofíticos sobre *L. coffeella* para cada tratamento ao longo de 15 dias de observação realizada no laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas em maio de 2021.

Com relação a mortalidade em função dos dias observados, o fungo 21E (*B. bassiana*), destacou-se por ter seu pico de mortalidade se deu logo no 2º dia, com 66,67% de sua mortalidade total. Para o fungo IBCB130 (*C. fumosorosea*) houve maior mortalidade entre o 4º e 6º dia, com pico de insetos mortos no 5º dia de observação com cerca de 30,23% de sua mortalidade total. Depois, houve outro pico no 13º dia com mais de 20,93% de sua mortalidade total, onde a mortalidade começou a abrigar pupas.

O isolado 5M teve seu pico de mortalidade observado no 6º dia, com 27,27% de sua mortalidade total, se mantendo alta também no 7º com 22,73%. O isolado 13E (*A. fumigatus*) apresentou maior mortalidade no 7º dia, representando 36,36 se mantendo constante no 8º e 9º dia com 18,18% da mortalidade total.

O isolado IBCB425 (*M. anisopliae*) teve seu pico de mortalidade no 2º dia com 37,5% de sua mortalidade total, onde teve uma queda no 3º dia em diante e apresentou um novo pico com um segundo pico no 5º e 12º dia, onde manteve igualmente 25% da mortalidade. E por fim, o isolado 32 M teve sua maior mortalidade concentrada no 11º dia, que contabilizou 50% de sua mortalidade total. A mortalidade da testemunha começou a surgir no 5º dia, com pouco mais de 12,5% de sua mortalidade total, se mantendo crescente ao longo do dia onde obteve seu pico apenas no 14º dia, penúltimo dia de observação com 37,5% de sua mortalidade total (Figura 26).

Esses resultados também foram observados no trabalho de Souza (2019), onde utilizou-se fungos endofíticos entomopatogênicos para o controle da broca-do-café e observou-se que a mortalidade das brocas foi mais elevada principalmente entre o 3º e 5º dia.

Com exceção do isolado 32M (*D. vulgaris*), todos os outros tiveram seu pico de mortalidade até o 7º dia de observação. Após, o único crescimento progressivo de mortalidade, foi relacionada a testemunha.

Silva *et al.*, (2003) Defendem que a fase larval é a mais recomendada para o estudo de entomopatogenicidade de fungos. No entanto, as larvas inoculadas começaram a entrar em processo de pupagem após 2 dias de inoculação e 8 dias depois, começaram a apresentar aspecto de infecção fúngica, tendo seu casulo e corpo envolvidos por micélio ou apresentando uma pupa incompleta, com o inseto morrendo no processo. O isolado que mostrou maior virulência em pupas, foi o IBCB130 (*C. fumosorosea*) representando 52,65% de sua mortalidade total. Em comparação, o isolado 21E (*B. bassiana*), mostrou maior virulência em lagartas, com 91,67% de sua mortalidade total.

TABELA 13. – % de mortalidade total (MT) de lagartas, pupas e adultos de *L. coffeella* causada por fungos endofíticos do cafeeiro e do banco de dados de fungos entomopatogênicos do Instituto Biológico de Campinas, Oldemar Cardim Abreu, nas concentrações 1x10⁸ conídios ml⁻¹

Fungo	% Mortes	EM*	% Mortes	EM*	%Mortes	EM*
	em lagartas		em pupas		em adultos	
IBCB130	39,25	5,23	52,65	9,34	8,10	5,78
21E	91,67	4,71	8,33	4,71	-	-
5M	50,67	9,85	44,33	12,87	5,00	4,47
13E	60,33	9,53	35,67	6,25	4,00	3,58
IBCB425	75,00	16,73	25,00	10,95	-	-
32M	50,00	17,89	50,00	17,89	-	-
Controle	50,00	16,51	12,50	15,21	37,50	19,24

*Em = Erro médio padrão

Para a confirmação do efeito entomopatogênico sobre o bicho-mineiro, os cadáveres foram retirados das gaiolas e transferidos para câmara úmida, em BOD a 25°C com fotofase de 12 horas. Dentre todos os tratamentos, 5M, (*A. clavatonanicus*) 21E (*B. bassiana*) e IBCB130 (*C. fumosorosea*) destacaram-se por apresentar maior número de insetos colonizados correspondentes ao fungo endofítico inoculado (MC-Mortalidade confirmada) correspondendo a 73,91%, 72,72% e 60,86% respectivamente (Tabela 14).

Contudo, O ensaio também revelou expressão de outros fungos que não foram inoculados (podendo ser classificados como contaminantes ou fungos necrófilos que só colonizam o corpo do inseto depois da morte).

Alguns cadáveres isolados também apresentaram expressão fúngica nula. Os isolados que apresentaram maior número de fungos incompatíveis com o isolado originalmente inoculado foram os fungos 32M, IBCB425 e 13E, com 57,14%, 75% e 37,5% respectivamente (Tabela 14). Já a incubação das lagartas mortas pelo isolado 32M (*D. vulgaris*) não resultou na colonização do corpo dos insetos.

A capacidade de colonização do fungo no corpo do inseto, é considerada uma característica importante para fungos com potencial entomopatogênico, visto que nesse processo, liberam estruturas reprodutivas que podem ser disseminadas através do vento, água ou superfície de hospedeiros, dando início a um novo ciclo de infecção em outros insetos (HAJEK e LEGER, 1994).



FIGURA 27. Isolamento de fungos encontrados em cadáveres de *L. coffeella* isolados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA que posteriormente foram utilizadas para estabelecer os índices de MC (mortalidade confirmada). Onde: A- Isolado correspondente do fungo *A. clavatonanicus* expressado no cadáver do inseto. B- Isolado IBCB130, C- Isolado de *B. bassiana* e D- *A. fumigatus*.

TABELA 14. – Porcentagem de mortalidade confirmada (M.C.) em cadáveres de *L.coffeella*, em função dos isolados testados no URL de controle biológico do Instituto Biológico nas concentrações 1×10^8 conídios ml⁻¹

FUNGO	Mc* (%)	Isolados incompatíveis (%)	Sem expressão fúngica (%)
21E	72,72%	13,63%	13,63%
13E	41,66%	37,5%	20,83%
5M	73,91%	13,04%	13,04%
32M	-	57,14%	42,85%
IBCB130	60,86%	32,60%	6,52%
IBCB425	25%	75%	-

*Mc: Mortalidade confirmada

5.7 Avaliação do potencial de infecção em mudas de café

No teste de inoculação de isolados em mudas de café, os fungos 5M (*A. clavatonanicus*) e IBCB130 (*C. fumosorosea*) apresentaram melhor capacidade de colonização endofítica dos tecidos foliares, sendo que o fungo IBCB130 foi encontrado presente em todas as 5 mudas testadas após a inoculação. O fungo 5M, se expressou em 5 das 5 mudas amostradas (Figura 28).



FIGURA 28. Resultados do experimento de inoculação de fungos em mudas de café, antes e depois da inoculação, por aspersão foliar, com suspensão dos endofíticos entomopatogênicos na concentração 1×10^8 conídios ml^{-1} , onde; A-Fungo *A. clavatonanicus* que apresentou capacidade de colonização dos tecidos foliares em 4 das 5 mudas e B- Fungo IBCB130, presente em 5 das 5 mudas testadas, após 7 dias de inoculação.

No entanto, os fungos 21E (*B. bassiana*), 13E (*A. fumigatus*) e IBCB425 (*M. anisopliae*) não se mostraram capazes de colonizar tecidos foliares, por isso os fungos foram inoculados novamente e plaqueou-se outros tecidos como caules e raízes, que permaneceram encubados em BOD por 7 dias. Os resultados da segunda inoculação, mostraram que o isolado

IBCB425 foi capaz de colonizar apenas um tecido foliar das 5 repetições em folhas. 21E e 13E continuaram sem expressão em folhas, caules e raízes. (Tabela 15), (Figura 29).



FIGURA 29. Resultados do experimento de inoculação de fungos em mudas de café, por aspersão foliar de suspensão fúngica com 1×10^8 conídios -1 onde; C- isolado IBCB425, que apresentou capacidade de colonização dos tecidos foliares em 1 das 5 mudas e D- Isolado 21E (*B. bassiana*), e isolado 13E (*A. fumigatus*) que não mostraram capacidade de colonização em folhas, caules e raízes de mudas de café Após 7 dias da segunda inoculação.

Com base nos resultados, é provável que os isolados 21E (*B. bassiana*), 13E (*A. fumigatus*) e IBCB425 (*M. anisopliae*) não tenham se expressado nos tecidos foliares devido a diferenças de crescimento no hospedeiro. Rodrigues & Redman (1997), afirmam que um endófito pode se expressar apenas no local de inoculação, se disseminar por toda planta através dos vasos condutores ou crescer pouco no hospedeiro, mas permanecer metabolicamente ativos.

Vega *et al.*, (2008) explica que os fungos entomopatogênicos produzem metabolitos secundários, antibióticos e toxinas que podem ter efeito sobre o inseto hospedeiro. Dessa forma, os metabolitos secundários podem ter sido responsáveis por provocar mortalidade em *L. coffeella* que se alimentaram das folhas inoculadas. Como *B. bassiana*, que causou alta taxa de MC (mortalidade confirmada), porém não foi capaz de se expressar em tecidos foliares.

Outro autor, Bruck (2010), cita que a mortalidade pode ser causada por compostos voláteis, que são emitidos pela planta em associação com os fungos, modificando assim o comportamento dos herbívoros.

A ausência de expressão de *M. anisopliae* após a inoculação em mudas foi notada também no trabalho de Vinha (2018) onde avaliou-se a persistência dos fungos entomopatogênicos em mudas de soja, e observou não ser possível a recuperação dos fungos

Metarhizium sp e em folhas, caules e raízes de soja, porém verificou-se a persistência de ambos no substrato utilizado durante 20, 45 3 60 dias.

O método utilizado neste experimento, é conivente com o descrito por Russo *et al* (2018) onde demonstraram a eficácia de três métodos de inoculação (spray foliar, imersão de raízes e imersão de sementes) para estabelecer uma relação endofítica com fungos entomopatogênicos. A porcentagem de recuperação desses fungos foi maior após o 7º dia de inoculação e o método mais efetivo foi o de aspersão foliar. Ainda, segundo Parsa *et al* (2013) o método de colonização endofítica pode variar de acordo com a espécie ou variedade da cultura alvo e da cepa ou isolado fúngico.

TABELA 15. – Resultado do teste de potencial de colonização de fungos endofíticos entomopatogênicos em mudas de cafeeiro, inoculados por aspersão foliar e avaliados após 7 e 14 dias de incubação em sala climatizada a 25°C. Realizado *in vitro* no laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas em junho de 2021.

Isolado	Expressão por repetição			
	Isolamento de folhas após 7º dias	Isolamento de caules após 7º dia	Isolamento de raízes após 7º dia	Isolamento de folhas após 14º dia
A. Clavatonanicus	Presente em 4/5 repetições	-	-	-
Controle	Ausente	-	-	-
IBCB 130	Presente em todas as repetições	-	-	-
Controle	Ausente	-	-	-
IBCB 425	Ausente	Ausente	Ausente	Presente em 1/5 repetições
Controle	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
B. Bassiana	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Controle	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
A. Fumigatus	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Controle	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

6. CONCLUSÕES

Houve variabilidade de espécies de fungos endofíticos e de acordo com o tecido vegetal, posição geográfica e localização.

Deste modo, a maior variabilidade foi encontrada na cidade de Itapira – SP, nos tecidos caulinares e em nas regiões Norte e Sul.

A patogenicidade de fungos demonstrou eficácia semelhante aos produtos fitossanitários utilizados no controle de *L. coffeella*.

Alguns produtos podem ter efeito sinérgico sobre o fungo, aumentando a conidiogênese e o crescimento vegetativo, não interferindo na viabilidade de conídios.

O impacto de produtos fitossanitários sobre os entomopatógenos pode variar de acordo com a espécie e linhagem do patógeno, da formulação dos produtos e das concentrações utilizadas. Esses produtos podem atuar inibindo o crescimento vegetativo, a conidiogênese e a esporulação dos microrganismos. Alguns produtos podem ter efeito sinérgico sobre o fungo, aumentando sua esporulação e crescimento vegetativo.

A maioria dos entomopatógenos estudados, apresentou um pico de mortalidade entre o 4º e o 7º dia de observação. Os isolados apresentaram diferentes níveis de patogenicidade para cada fase do ciclo de vida de *L. coffeella*.

7.0. REFERENCIAS

AGRIANUAL. Anuário da agricultura Brasileira. São Paulo: FNP: Consultoria Andamp; Comércio: 497 p. 2016.

ARAUJO, W. L. *et al.* **Manual de Isolamento de microrganismos endofíticos**. Esalq, Piracicaba, 2002, 86 p

AMATUZZI, F.R.; Fungos endofíticos do morangueiro e potencial de controle biológico de *Duponchelia Fovealis zeller* (Lepidoptera: Crambidae). Dissertação de mestrado – Universidade federal do Paraná. P51:36-37, 2014.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, v. 21, n. 2-3, p. 51-66, 2007. Aly, A. H.; Debbad, A.; J.; Proksch, P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 90, 1829.

AVILES, D.P., MATIELLO, J.B. PAULINI, A.E.; PINHEIRO, M.R. Infestação de bichomineiro em Catuaí e Conilon em lavouras intercaladas e isoladas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 10., 1983, Poços de Caldas. Resumos... Rio de Janeiro: IBC/ GERCA, 1983. p.324-325.

BADII, M. H.; ABREU, J. L. Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *International Journal of Good Conscience*, v. 1, p. 82-89, 2006.

BATISTA, F. A. Controle biológico e o manejo integrado de pragas. *Biológico*, v. 55, p. 3639, 1989.

BACKMAN, P.A.; SIKORA, A.R. Endophytes: Na emerging tool for biological control. *Biological control*, v.46, p.1-3, 2008

BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C.; LATGE, J. P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*, v.54, p.1795-1805, 1988.

BRASIL. Ministério da Educação. Caderno de aulas práticas dos Institutos Federais: cafeicultura. Ministério da Educação, Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica: Brasília, DF, 2016. 115 p.

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

BUTT, T. M.; WANG, C.; SHAH F. A.; HALL, R. Degeneration of entomogenous fungi. In J. Eilenberg & H. M. T. Hockkanen (Eds.), *Na Ecological and societal approach to Biological Control*, 2006, p. 213-226.

CARVALHO, S. B. G.; PEREIRA, M. Fungos endofíticos em raízes de *Prosthechea pachycephala* (Orchidaceae) da Serra do Cipo – MG. *Natureza online*, Santa Tereza-ES, 9 p. 2016. Disponível em: <<http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/NOL20160305%20%20c%C3%B3pia%20corrigida%20autor.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2018.

CHARNLEY, A.K; COLLINS, S.A.. *The mycota IV: Environmental and microbial Relationship*. 2ed. Springer-verlag, Heidelberg, Berlin, p. 159-184, 2007.

COLE, G.T.; HOCH, H.C, EDS. *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. New York: Plenum, 1991

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de café, safra 2019, n.1 - Primeiro Levantamento, Brasília, p. 1-62, Jan.2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/infoagro/safras/cafe>> Acesso em: 10 de out. de 2019.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de café, safra 2021, n.1 - Primeiro Levantamento, Brasília, p. 1-62, Jan.2021. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/infoagro/safras/cafe>> Acesso em: 10 de jun. de 2021.

CONCEICÃO, C.H.C. *Biologia, dano e controle do bicho-mineiro em cultivares de café arábica*. 2005. 86p. Dissertação (Mestrado em Agricultura tropical) – Insituto Agrônômico, Campinas, 2005.

COSTA, F. M. D. et al. Análise estatística das distribuições espaciais do bicho- mineiro do cafeeiro e das vespas predadoras. *Coffee Science*, v. 10, n. 2, p. 149-157, 2015. D. (Ed.) *Encyclopedia of pest management*. London: Taylor & Francis, 2006.

DE FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, v. 43, p. 237-256, 2007

DEVOTTO, L. M.; GERDING, A.; FRANCE, A. Hongos entomopatógenos: una alternativa para la obtencion de Biopesticidas. *Bioleche*, v. 23, p. 30-33, 2000.

DRAGANOVA, S. A.; TOMOV; R. I. Virulence of a strain *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetes, Deuteromycotina) against larvae of *Leucoptera malifoliella* Costa (Lepidoptera, Lyonetiidae). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, v. 4, p. 435-439, 1998.

DUPIER. Diferença entre café Arábica e Robusta. 2017. Disponível em: . Acesso em: 27 mar. 2019.

EMBRAPA. Principais pragas do cafeeiro no contexto do manejo integrado de pragas. 2015. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/6694669/artigo-principais-pragas-do-cafeeiro-no-contexto-do-manejo-integrado-de-pragas> > Acesso em: 09/09/2020

FANG, W.; LENG, B.; XIAO, Y.; JIN, K.; MA, J.; FAN, Y.; FENG, J.; YANG, X.; ZHANG, Y.; PEI, Y. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 363-370, 2005.

FERREIRA, A.J. MATIELO, J.B. ; PAULINI, AE. Provável resistência do cultivar Conilon (*C. canephora*) à infestação de bicho mineiro do cafeeiro, *Perileucoptera coffeella* (Guér.-Mém., 1842). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA CAFEIRAS, 7., 1979, Araxá. Resumos... Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1979. p.330-331.

FRAGOSO, D.B.; GUEDES, R.N.C.; PICANÇO, M.C; ZAMBOLIM, L. Insecticide use and organophosphate resistance in the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetidae). *Bulletim Entomological Research*, v.92, p.203-212. 2002.

Fragoso, D.B.; Guedes, R.N.C.; Rezende, S.T. Glutathione S-transferase detoxification as a potential pyrethroid resistance mechanism in the weevil, *Sithophilus zeamais*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.109, p.21- 29. 2003.

FREIRIA, W. C. Bicho mineiro: Controle agora e tenha uma safra tranquila. *Revista COCAPEC*, 2017. Disponível em: . Acesso em 14 abr. 2019.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA, S.; CARVALHO, R. P.; BAPTISTA, G. C.; BERTI, E.; *Entomologia Agrícola. FEALQ. vol. 10. 2002. 920p. FEALQ.*

GONÇALVES, W.; PARRA, J.R.P.; PRECETTI, A.;A.C. Parasitos e predadores de *Perileucoptera coffeella*(Guerin- Meneville, 1842) em três regiões do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA CAFEIRAS, 6., Ribeirão Preto, 1978. Resumos... Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1978. p.272-274.

GUEDES, R.N.C; ZHU, K.Y; DOUVER, B.A; KAMBHAMPATI, S. Partial characterization of phosphotriesterases from organophosphate-susceptible and resistant populations of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. v.57, p.156-164. 1997.

GUEDES, R.N.C. Resistência de insetos a inseticidas. p. 101-107. In ZAMBOLIM, L. I Encontro sobre manejo de doenças e pragas. Viçosa: UFV, 1999. 146p.

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

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

HIBBETT, D. S.; OHMAN, A.; GLOTZER, D.; NUHN, M.; KIRK, P.; NILSSON, R. H. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Review*, v. 25, p. 38-47, 2011.

ICO. International Coffee Organization. Disponível em: <http://www.ico.org/trade_statistics.asp?section=Statistics> Acesso em: 24 jul 2019.

IGNOFFO, C. M. Effects of entomopathogens on vertebrates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 217, p. 141-172, 1973.

INGLIS, G. D.; ENKERLI, J.; GOETTEL, M.S. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. In: *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, ed. LL Lacey, Amsterdam: Academic, 2012, p.189-253.

INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ (IBC). *Cultura do café no Brasil, pequeno manual de recomendações*. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro do Café, 1986. 214p.

JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAM, R. T. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. *Journal of Microbiology Biotechnology Research*, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.

Katiyar KP, Ferrer F (1968) *Biologia técnica e esterelização do bicho-mineiro do café, Leucoptera coffeella* Guér (Lepidoptera-Lyonetiidae). In: Agência Internacional de Energia Atômica, Viena IAEA, p.165-175.

KONNOROVA, E.; DE LA VEGA, A. Nocividad de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera : Lyonetiidae). III. Características y dimensiones de las lesiones producidas a las hojas Del cafeto. *Cienc. Tec. Agric. Café y Cacao* 7:25-40. 1985.

Li, X.; Schuler, M.A.; Berenbaum, M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, v.52, p.231-253. 2007.

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/> Acesso em 20 de agosto de 2016.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Café no Brasil*. Disponível em:<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politicaagricola/cafes/cafeculturabrasileira>>. Acesso em: 16 mar 2019.

MAPA. Café no Brasil. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/ptbr/assuntos/politicaagricola/cafe/cafeicultura-brasileira>> Acesso em: 10 Out. de 2019.

MELO, T. L. Manejo do Bicho-Mineiro na Bahia: redução do volume de pulverização, eficácia de inseticidas e impacto sobre parasitismo natural. Vitória da Conquista-BA: UESB, 2017.

MENDES, J.E.T. O sombreamento e os cafezais paulistas. Boletim da Superintendência a serviço da cafeicultura, São Paulo, x.19, n.205, p. 257-267, 1944.

MESSING, R.; CROFT, B.A. Insecticide in pest management. In: Metcalf, R.L.; Luckman, W.H. (Eds.). Introduction to insect pest management. New York: John Wiley & Sons, 1982. p.217-277.

MICHEREFF, M.F.F.; MICHEREFF-FILHO, M.; VILELA, E.F. Comportamento de Acasalamento do Bicho-Mineiro-do-Cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (GuérinMèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). Neotropical Entomology, v.36, p.376- 382. 2007.

MICHEREFF, M.F.F.; Comportamento reprodutivo do bicho-mineiro-do-cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Guérin - Méneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae). 2000. 46p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa: UFV, Viçosa.

MISTRO, J. C. A cultura do café. Instituto Agrônômico (IAC/APTA), São Paulo, 2012. Disponível em: < <https://petfaem.files.wordpress.com/2013/10/a-cultura-do-cafc3a9.pdf>>. Acesso em: 15 mai. 2019

MONTEIRO, M. C. P. Fungos endofíticos de cafeeiro produtores de compostos orgânicos voláteis e enzimas extracelulares. 2016. 96 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola)Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

NANTES, J.F.D, Parra J.R.P, Avaliação de danos causados por *Perileucoptera coffeella* (Guérin - Méneville, 1842) (Lepidoptera-Lyonetiidae), em três variedades de café (*Coffea spp.*), 1977.

Neves, Pedro Manuel, y Santoro, Patricia Helena, y "Técnicas e parâmetros utilizados nos estudos de compatibilidade entre fungos entomopatogênicos e produtos fitossanitários." Semina: Ciências Agrárias, vol. 26, no. 3, 2005, pp.305-311

NOTLEY F.B. Os mineiros da folha de *Leucoptera* de café em Kilimanjaro. *I. Leucoptera coffeella* , Guér .. Boletim de Pesquisa Entomológica, Londres, 39 (3): 339-416 . 1948.

OLIVEIRA, M. A. S.; SAMPAIO, J. B. R.; ALVES, R. T. Flutuação populacional do bicho-mineiro *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) em cafeeiro no Distrito Federal. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1992. 3p.

OLIVEIRA, M. A. S.; SAMPAIO, J. B. R.; GOMES, A. C. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 2 Cafeeiro no Distrito Federal. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento EMBRAPA, n. 2, p. 1–19, 2001.

OLIVEIRA, I. P. et al. Cultura de café: histórico, classificação botânica e fases de crescimento. Revista Faculdade Montes Belos, v. 5, n. 4, p. 1-16, 2012.

PARRA, J.R.P. Biologia comparada de *Perileuoptera coffeella* (Guérin-Meneville, 1842) (Lepidoptera - Lyonetiidae), visando sua zoneamento ecológico no Estado de São Paulo. Rev. Brás. Entomol. 29: 45-76. 1985.

PAULINI, A.E.; FERREIRA, A.J.D.; ANTONIO, A.M.; MATIELLO, B.J. Efeito da desfolha causada por bicho-mineiro na produtividade do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 5., Guarapari, ES. Resumos... Rio de Janeiro: IBC/GERCA, p. 146, 1976.

PEREIRA, E. J. G.; et al. Controle natural do bicho mineiro do cafeeiro no início do período seco. Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil (3.: 2003 : Porto Seguro, BA). Resumos. Brasília, D.F. : Embrapa Café, 2003.

RAMIRO, D. A.; GUERREIRA-FILHO, O.; QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; MATTHIESEN, S. C. Caracterização anatômica de folhas de cafeeiro resistentes e susceptíveis ao bichomineiro. Bragantia, v. 63, n. 3, p. 367-372, 2004.

RAMIRO, D. A.; et al. Caracterização anatômica de folhas de cafeeiros resistentes e susceptíveis ao bicho-mineiro. Bragantia, Campinas, v. 63, n.3, p. 363-372, 2004.

REIS, P. R.; SOUZA, J. C.; MELLES, C. C. A. Pragas do cafeeiro. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.10, p.3-57, 1984

REIS, P. R.; SOUZA, J. C. de. Pragas do cafeeiro. In: RENA, A. B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M.; YAMADA, T. Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1986. p. 323-378

REIS, P.R., SOUZA, J.C. Manejo integrado do bicho-mineiro *Perileuoptera coffeella* (GuérinMèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae), e seus reflexos na produção de café. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v.25, p.77-82, 1996.

REIS, P. R.; SOUZA, J. C. de. Manejo Integrado das pragas do cafeeiro em Minas Gerais. Informe Publicitário, Belo Horizonte, v. 19, n. 193, p. 17-25, 1998.

REIS, P. R.; SOUZA, J. C.; VENZON, M. Manejo ecológico das principais pragas do cafeeiro. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 23, n. 214/215, p. 83-99, 2002.

REVISTA CAFEICULTURA. O cafeeiro. Disponível em: <<https://revistacafeicultura.com.br/?mat=7016>> . Acesso em: 05 set. de 2019.

ROY, H. E.; STEINKRAUS, D.; EILENBERG, J.; HAJEK, A. E.; PELL, J. K. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annual Review Entomology*, v. 51, p. 331-357, 2006.

RUSSO, M.L., PELIZZA, S.A., VIANNA, M.F., ALLEGRUCCI, N., CABELLO, M.N, TOLEDO, A.V., MOURELOS, C., SCORSETTI, A.C. Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) Mee. Growth and yield. *Journal of King Saud University, Amsterfam*, 2018.

SANTOS, P. M. Café. CEPLAC, 2018. Disponível em: . Acesso em: 15 mai. 2019

SCHOLTE, E. J.; KNOLS, B.G.J.; SAMSON, R. A.; TAKKEN, W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science*, v. 4, p. 19-24, 2004.

SILVA, V.C.A.; BARROS, R.; MARQUES, E.J.; TORRES, J.B. Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Neotropical Entomology*, v.32, n.4, p.653-658, 2003. SOUZA, J. C. Café: controle do bicho mineiro precisa ser feito a partir de agora para garantir grande safra em 2018. *Notícias Agrícolas*, 03 mar. 2017. Disponível em: . Acesso em: 22 jun. 2019.

SOARES, F. B. Impacto de fungicidas e inseticidas na densidade populacional de *beauveria bassiana* no solo sob efeito da microbiota nativa. Dissertação de mestrado. Unesp de Jaboticabal. 70 f., 2011

SOUZA, J. C. DE., REIS, P. R., SALGADO, L., MELLES, C. DO C. A.. *Pragas do cafeeiro*. Belo Horizonte: EPAMIG, 1981. 65p.

SOUZA, J. C.; REIS P. R.; BERTHI FILHO, E. Levantamento, identificação e eficiência dos parasitos e predadores do bicho-mineiro das folhas do cafeeiro, *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidoptera- Lyonetiidae) no Estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 8., 1980, Campos do Jordão. Resumos... Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1980. p.121-122.

SOUZA, J. C. de; REIS, P. R.; RIGITANO, R. L. de O; RENÊ, L. de O. Bicho mineiro do cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado. *Boletim Técnico EPAMIG*, v. 2, n. 54, 1998.

SOUZA, J.C., P.R. Reis & R.L.O. Rigitano. 1998. Bicho-mineiro-do-cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado. Belo Horizonte, EPAMIG, 48p

SOUZA, J.C; REIS, P.R; RIGITANO, R.L.O. Bicho-mineiro do cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado. 2. ed. rev., 1998, p.7-20.

SPEER, M. Observações relativas à biologia do “bicho-mineiro” das folhas do cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Ménéville) (Lepidoptera: Buccolaticidae). Arquivos do Instituto Biológico, v.19, p.31-47, 1949.

ST. LEGER, R. J.; WANG, C. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve efficacy against insect pests. Applied of Microbiology and Biotechnology, v. 85, p. 901- 907, 2010.

TAN, R. X.; ZOU. W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolite. Natural Product Report, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

TOLEDO FILHO, J.A. A ocorrência de bicho-mineiro no cafeeiro. Campinas, CATI. Boletim Fitossanitário-Bayer, 1982. 4p.

VEGA, F.E.; Posada, F.; Infante, F. Coffe insect: ecology and control. In: PIMENTEL, D. (Ed.). Encyclopedia of pest management. New York: Cornell University, 2007, p. 95-98.

VEGA. F.E., POSADA F.M., AIME C., PETERSON W.S.A. Fungal endophytes in green coffee seeds. Institute of Microbiology. 27(1): 75-84, 2008

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

VEGA, F. E.; MEYLING, N.; LUANGSA-ARD, J.; BLACKWELL, M. Fungal Entomopathogens. Insect Pathology, p.171-220, 2012.

VIEIRA, P. D. S.; Fungos endofíticos associados a algodoeiros transgênicos e não transgênicos. Dissertação de mestrado. Universidade federal de Pernambuco. p. 96, 2010

VINHA, B.F., Potencial da inoculação de fungos entomopatogênicos no plantio da soja para o manejo de pragas. Dissertação – USP – Escola superior de Agricultura! Luiz de Queiroz”. P 76-77. 2018

WAGNER, B.L.; LEWIS, L.C. Colonization of Corn, Zea mays, by the Entomopathogenic Fungus Beauveria bassiana. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 34682473, 2000

WALKER DW, Q.V. (1969) Comportamento e comportamento de oviposição do bichomineiro, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera - Lyonetiidae). Anais da Sociedade Entomológica de Washington 71: 88-90.

WALKER, D.W.; QUINTANA, V. Matting and oviposition behavior of the coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera–Lyonetiidae). Proceedings of the Entomological Society of Washington, Washington, v.71, n.1, p. 88-90, 1969

ZAMPIROLI, R.; Eficácia do controle químico em área comercial para manejo do bichomineiro. Universidade Federal de Uberlândia. p 27-33,2016