

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GUILHERME HENRIQUE MUELLER

FUSARIUM SP., NOVO PATÓGENO PARA *AGRAULIS VANILLAE* E SEU USO NO
CONTROLE BIOLÓGICO

SÃO GABRIEL

2024

GUILHERME HENRIQUE MUELLER

FUSARIUM SP., NOVO PATÓGENO PARA *AGRAULIS VANILLAE* E SEU USO NO
CONTROLE BIOLÓGICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Jair Putzke

Coorientador: Dr. Andreas Köhler

São Gabriel
2024

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

M946f Mueller, Guilherme Henrique
Fusarium sp., novo patógeno para *Agraulis vanillae* e seu uso no controle biológico / Guilherme Henrique Mueller.
53 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2024.
"Orientação: Jair Putzke".

1. Biocontrole . 2. Fungos Entomopatogênicos . 3. Lepidoptera. I. Título.

GUILHERME HENRIQUE MUELLER

FUSARIUM SP., NOVO PATÓGENO PARA *AGRAULIS VANILLAE* E SEU USO NO CONTROLE BIOLÓGICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Dissertação defendida e aprovada em: 14, março de 2024.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Jair Putzke
Orientador
UNIPAMPA

Prof. Dr. Andreas Köhler
UNISC

Prof. Dra. Lilian Pedroso Maggio
URI



Assinado eletronicamente por **JAIR PUTZKE, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/03/2024, às 16:09, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Andreas Köhler, Usuário Externo**, em 14/03/2024, às 17:06, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Lilian Pedroso Maggio, Usuário Externo**, em 25/03/2024, às 13:21, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1391536** e o código CRC **B3993B62**.

Dedico essa dissertação aos meus pais, Edson e Solange, e à minha irmã Maísa. Obrigado por tudo.

RESUMO

Controle biológico ou biocontrole são medidas alternativas além do uso de pesticidas químicos para se administrar a população de organismos indesejáveis. O seu uso pode ser aplicado de diversas maneiras e se utilizando de diferentes agentes controladores. Com o crescimento do mercado de produtos orgânicos e novas legislações em busca de métodos mais ecológicos na indústria se desenvolve em conjunto o controle biológico além de sua demanda. Torna-se útil a aplicação de biocontrole no controle de pragas, e essas são lagartas e traças. Essas pragas podem acarretar em danos variados de 20% até 100% da produção. Microorganismos como bactérias, vírus e fungos são agentes controladores interessantes de se trabalhar pela sua variedade genética, além de possível fazer sua utilização isolada ou acompanhada de outros tratamentos. Nesse contexto investigou-se possíveis agentes controladores, em especial fungos por serem organismos versáteis e possíveis de serem aplicados sobre a cutícula do inseto, sem a necessidade de ingestão. Desta exploração isolou-se de uma larva de *Agraulis vanillae* (praga do cultivo de maracujá - *Passiflora edulis*) o patógeno identificado como *Fusarium* sp., um fungo filamentosos conhecido por sua produção de metabólitos tóxicos. Com objetivo de revisar fungos infecciosos para *A. vanillae*, se modelou um estudo em busca de fungos causadores de infecção tanto em *A. vanillae* quanto em *Dione juno* (principal lagarta praga do maracujá). Os resultados obtidos deram luz a três espécies já citadas: *Akanthomyces lecanii*, *Cordyceps tenuipes* e *Beauveria bassiana*. Creditando *Fusarium* sp. como a quarta citação listada. Segundo teste foi direcionado ao potencial do patógeno de causar mortalidade em larvas. Em busca de insetos modelos para a pesquisa, se utilizou *Ephestia kuehniella* Zeller, traça conhecida por causar danos em produtos estocados. O teste foi conduzido em larvas, se aplicando tratamento comercial, sendo sua base conídios do fungo *Beauveria bassiana*, enquanto outros quatro tratamentos foram montados originados a partir do isolado de *Fusarium* sp. (100%, 50%, 25% e 10%). As larvas foram observadas durante dezesseis dias e acompanhadas quanto a sua mortalidade. Os resultados encontrados demonstram a eficácia de *Fusarium* sp. como novo patógeno sugerindo seu potencial uso para futuras aplicações como controlador biológico.

ABSTRACT

Biological control or biocontrol, offers alternative methods to manage populations of unwanted organisms besides the use of chemical pesticides. This approach can be applied in various ways, utilizing different control agents. As the organic market grows and new legislation seeks more ecological practices, biocontrol methods are developing alongside the increasing demand. Biocontrol proves particularly useful in pest control, including for caterpillars and moths, which can inflict damage ranging from 20% to 100% on cultivated crops. Microorganisms like bacteria, viruses, and fungi serve as interesting control agents due to their diverse genetic makeup and the possibility of using them independently or in combination with other treatments. This study specifically investigated fungi as potential control agents, particularly due to their versatility and ability to be applied directly on the insect's cuticle, eliminating the need for ingestion. An exploration led to the isolation of a pathogen identified as *Fusarium* sp. from a larva of *Agraulis vanillae* (a pest of passion fruit cultivation, *Passiflora edulis*). This filamentous fungus is known for producing toxic metabolites. To review fungi infectious to *Agraulis vanillae*, a study was designed to identify fungi causing infection in both *A. vanillae* and *Dione juno* (the main caterpillar pest of passion fruit). The results confirmed the effectiveness of three previously mentioned species: *Akanthomyces lecanii*, *Cordyceps tenuipes*, and *Beauveria bassiana*, with *Fusarium* sp. being the fourth identified pathogen. A second test assessed the pathogen's ability to cause mortality in larvae. *Ephestia kuehniella* Zeller, a moth known for damaging stored products, served as a model organism. The test involved applying a commercial treatment based on conidia of the fungus *Beauveria bassiana* to larvae. Additionally, four other treatments were prepared using the *Fusarium* sp. isolate at different concentrations (100%, 50%, 25%, and 10%). The larvae were observed for sixteen days and monitored for mortality. The results demonstrated the efficacy of *Fusarium* sp. as a new pathogen, suggesting its potential as a future biological control agent.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Controle biológico	10
1.2 Pragas agrícolas: Lepidoptera	11
1.3 Fungos entomopatogênicos	12
1.4 <i>Fusarium</i>	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. RESULTADOS	16
3.1 Artigo 1:	17
3.2 Artigo 2:	41
4. CONCLUSÃO	57
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 Controle biológico

Controle Biológico é a prática milenar utilizada pelo ser humano mesmo antes da nomenclatura ser utilizada para essa técnica, podendo ser citada na criação de gatos para proteção de grãos armazenados contra ratos e camundongos ou como foi utilizada na China, quando formigas foram movidas para pomares com o objetivo de controlarem a população de lagartas (WAAGE; GREATHEAD, 1988; HAJEK, *et al.*, 2016).

Em busca de se preservar recursos naturais sem acarretar em bioacumulação de pesticidas químicos em locais de produção rural, se concebeu que o biocontrole, com uma substituição gradativa, não seria apenas uma estratégia, mas uma filosofia para reduzir doenças e pragas. Em comparação aos pesticidas químicos, o controle biológico teria efeitos mais específicos no hospedeiro, além de não acumular resíduos potencialmente tóxicos depois de sua aplicação (LEUNG *et al.*, 2020; COLLINGE *et al.*, 2022).

O entendimento do ciclo de doenças, condições ambientais e ecológicos se torna essencial para atingir o controle biológico, sendo usualmente manipulados fatores ambientais para encorajar predadores e microrganismos a desempenharem seu papel em campo (COLLINGE *et al.*, 2022).

Controle biológico é um termo amplo, a primeira vez que foi utilizado fez referência ao uso de insetos exóticos para acabar com uma população de insetos pragas. Hoje entende-se o termo como o uso de controladores de qualquer espécie exceto os pesticidas químicos. Para plantas, como exemplo, é definido como inibição direta ou indireta de uma doença ou de patógeno, por outro organismo. Mas em termos gerais, controle biológico pode referir-se à inserção de um agente de nível trófico superior para controle de uma praga invasora (ocupante de um nível trófico inferior). A seleção de agentes biocontroladores podem incluir cuidados como: forma de inserção no meio, manejo da população de inimigos naturais e registros da quantidade e frequência de indivíduos introduzidos no meio (WAAGE; GREATHEAD, 1988; COLLINGE *et al.*, 2022; HODDLE *et al.*, 2023).

Nematóides, caracóis, ácaros, microorganismos e insetos são exemplos de agentes controladores ou inimigos naturais. Muitos são específicos para o seu hospedeiro, podendo atuar como: parasitas, parasitóides, predadores, competidores ou antagonistas (WAAGE; GREATHEAD, 1988; HAJEK, *et al.*, 2016, HODDLE *et al.*, 2023)

Existem classificações diferentes para o modo de aplicação do controle biológico: controle biológico de aumento que dispõe da liberação contínua de uma população de agentes; controle biológico clássico, classificado como a liberação de um agente exótico para seu estabelecimento no controle de certa praga; controle biológico de inoculação, técnica descrita como a soltura de agentes controladores em determinadas épocas do ano; quando a liberação é massiva para controle de uma geração específica de pragas, o controle recebe o nome de inundação; por último, o mais recente controle biológico empregado é o de conservação, com o objetivo de preservar o ambiente natural para populações de agentes naturais perseverarem sobre as espécies pragas (WAQUIL, 2002; LEUNG *et al.*, 2020)

O crescimento do mercado de alimentos orgânicos e a nova legislação com empenho em reduzir o uso dos pesticidas sintéticos, aumentou a busca por produtos à base de controladores biológicos (LEUNG *et al.*, 2020). Organismos vivos podem adquirir resistência ao controle químico, e além de afetarem pragas e doenças, a aplicação desses inseticidas podem diminuir microrganismos de importância para a área tratada (LIU, 2021).

Hoje, o biocontrole depende de uma interação de vários fatores, como diversidade de controladores biológicos, gestão de cultura e clima. Carecendo de mais pesquisas de inimigos naturais e das populações de organismos que se tenta conter (HOLLAND *et al.*, 2016).

1.2 Pragas agrícolas: Lepidoptera

Espécies pragas são um problema de longo prazo para a agricultura, e um grupo de destaque são lagartas e traças. Esses insetos variam seus danos, atacam desde cereais armazenados, causam mortalidade em plântulas, danificam folhas do cultivo, além de causarem injúrias na planta ao perfurarem colmos e pedúnculos. Um dos meios de monitorar os danos econômicos causados é estimando periodicamente a densidade populacional e quantificar seus danos (WAQUIL, 2002).

Os danos à plantações podem ser severas, como é o caso da traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta* (Meyrick, 1917)), onde as perdas podem ser de 80% a 100% (EL-AASSAR; SOLIMAN; ABD ELAAL, 2015). Mesmo larvas que afetam esporadicamente o cultivo da bananeira, à exemplo *Scopula rubraria* (Doubleday, 1843) e *Epyaxa rosearia* (Doubleday, 1843), se persistirem ao segundo ou terceiro ano causam danos irregulares à planta, causando prejuízos de até 30% (MANSFIELD *et al.*, 2021). A desfolha excessiva, além de reduzir a área fotossintética da planta pode acarretar na má formação de botões florais e, conseqüentemente, afetar a produção de frutos (GÓNGORA *et al.*, 2023). *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797)

ou lagarta-do-cartucho é uma praga que da mesma forma acarreta em prejuízo na produção do milho, causando perda de 5-20% da produção, e em casos de extensa infestação se alimentam dos grãos da espiga. Essa lagarta pode afetar mais de 350 plantas além de possuir hábitos migratórios, representando uma ameaça para novos habitats. Sem o devido controle, as perdas na produção do milho podem variar entre 8,3 e 20,6 milhões de toneladas (KUMAR *et al.*, 2022).

Mudanças climáticas são outro fator importante no impacto de pragas na produção comercial. O clima afeta diretamente o ambiente e a distribuição de insetos, além de que surtos de pragas têm relação direta com extremos climáticos. Como a exemplo de uma praga bem distribuída: traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella* (L., 1758)), esta ocasiona dano às pastagens, e com as alterações no clima, proporcionou o crescimento da população dessa espécie, ocasionando novas invasões, sendo seus danos estimados em até 18% em toda Nova Zelândia (MANSFIELD *et al.*, 2021).

O manejo bem sucedido da população de insetos está relacionada com fatores ecológicos, e informações sobre como a praga se relaciona com o ambiente, como condições de temperatura ótimas, níveis de umidade e sua relação com inimigos naturais são imprescindíveis (LEUNG *et al.*, 2020; MANSFIELD *et al.*, 2021). O bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville, et al., 1842)) que ataca o cultivo de café é um inseto em que se há vários relatos de seus inimigos naturais, sendo conhecido o fato de que a não presença desses afeta a população do inseto, tendendo ao crescimento. Ademais, o uso de biotecnologia aprimorou o controle do bicho-mineiro, sendo já usado gene de bactéria entomopatogênica (*Bacillus thuringiensis*), com o objetivo de criar resistência em plantas de café (GÓNGORA *et al.*, 2023). O uso de inseticidas químicos se mostra uma prática com certo limite no momento que as pragas criam resistência ao produto, o que já vem ocorrendo no Brasil, logo entender a interação do inseto com o ambiente torna possível um melhor controle do mesmo, (EL-AASSAR; SOLIMAN; ABD ELAAL, 2015; GÓNGORA *et al.*, 2023).

1.3 Fungos entomopatogênicos

O uso de pesticidas químicos gera resistência em populações de insetos. Esse motivo contribuiu com o aumento de alternativas ecológicas para supressão de pragas, a exemplo de microrganismos que podem ser aplicados isolados ou em associação com outros tratamentos como: bactérias, vírus e fungos (QIN et al., 2023). Fungos, em especial, são organismos versáteis, infectando mais de 100 gêneros de insetos, contabilizando mais de 750 espécies. Das

vantagens de se utilizar fungos entomopatogênicos são a sua especificidade ao hospedeiro, modo variado de ação e virulência além do não desenvolvimento de resistência no inseto, pois como organismo vivo o patógeno também se adapta ao seu ambiente em competição com o sistema imunológico do organismo em que infecta (DAR; RATHER; KANDOO, 2017)

Com a habilidade de secretar enzimas específicas (hidrolíticas, proteases, quitinases, entre outras) e metabólitos secundários que auxiliam na infecção, fungos entomopatogênicos podem afetar os insetos diretamente pela cutícula do hospedeiro, sem necessidade de ingestão do mesmo. Dos gêneros fúngicos mais relevantes no mercado de controle biológico podem ser citados *Metarhizium*, *Nomurea*, *Verticillum* e *Beauveria*, esse último já descrito seu ataque em larvas de *Scopula rubraria* e *Epyaxa rosearia*, citadas como causadoras de danos agrícolas (DAR; RATHER; KANDOO, 2017; MANSFIELD et al., 2021; QIN et al., 2023).

Os micoinseticidas mais populares no mercado possuem em sua formulação *Metarhizium anisopliae* ou *Beauveria bassiana*. *B. bassiana* é um dos fungos mais presentes em formulações de micoinseticida, representando 33,9% do comércio, conseguindo infectar mais de 700 espécies. O mecanismo de ação dos micoinseticidas é normalmente o mesmo independente do fungo utilizado, sendo sua ação centrada na liberação de conídios no meio. Em 2016, inseticidas que baseavam sua formulação em fungos representavam cerca de 10% do mercado global de biopesticidas, possuindo potencial de crescimento, sendo essencial para o desenvolvimento de novos produtos que esses organismos possam se adaptar a diferentes ambientes (JIANG; WANG, 2023).

1.4 *Fusarium*

O gênero *Fusarium* (Nectriaceae, Hypocreales) abriga várias espécies de fungos filamentosos conhecidos por causar mazelas em cultivos agrícolas e em geral destaca-se sua produção de metabólitos secundários tóxicos (DE HC MACIEL et al., 2021). Todavia, pesquisas relacionadas ao parasitismo e controle de insetos cresceram em torno do gênero e se há conhecimento que *Fusarium* infecta as principais ordens de insetos-praga: Coleoptera, Lepidoptera e Hemiptera. *F. fujikuroi*, *F. solani* e *F. oxysporum*. *F. solani* e *F. fujikuroi* são alguns complexos de espécies mais frequentes em relação à infecção de insetos, sendo que mesmo exógenas, estas se adaptam bem ao ambiente gerando compatibilidade ecológica com pragas além de reduzir a acumulação de inseticidas sintéticos no meio (MANTZOUKAS et al., 2022).

Micotoxinas podem exibir toxicidade alta a moderada, e das toxinas produzidas por *Fusarium*, essas afetam primeiramente tecidos vivos em diferentes estágios da vida do inseto. Desde os anos 50 existem relatos de associação *Fusarium* e insetos, aumentando o número de casos até os anos 90, a exemplo Hajek *et al.* (1993) apresentou em seu trabalho a relação oportunista do fungo em larvas de mariposa. Atualmente, apesar de ser uma das ordens mais testadas para aplicações de *Fusarium*, Lepidoptera apresenta uma das menores taxas de mortalidade (JESTOI, 2008; DA SILVA SANTOS *et al.*, 2020)

A maior preocupação acerca do uso de pesticidas biológicos seria seus efeitos em diferentes organismos que não a espécie praga, ou suas consequências na cadeia alimentar. Porém até o momento ainda não se conhece totalmente as implicações do controle biológico em insetos não-alvos, sendo que não há evidências do decréscimo de outras populações após a inserção de um patógeno específico para com o inseto que será seu vetor. Importante ressaltar que mesmo cepas mais comercializadas como *B. bassiana* e *M. anisopliae* são relativamente seguras, isso devido a fungos entomopatogênicos tenderem a ter uma relação específica com seu hospedeiro, não acarretando em infecções em outros insetos devido a sua ampla diversidade e coevolução com seus alvos. (THUNGRABEAB; TONGMA, 2007; DRIESCHE; HODDLE, 2017). Novos estudos devem ser feitos para se atestar a virulência de novas cepas de *Fusarium*, incluindo parâmetros de segurança e testes de aplicações. As condições de cultivo, marcadores genéticos e silenciadores de genes atuam como ferramenta para selecionar um organismo perfeito como controlador biológico, e pesquisadores almejam a seleção de cepas não virulentas para espécies não-alvo e melhores taxas de mortalidade para o hospedeiro do fungo. Nesse sentido, *Fusarium* tem grande potencial para novos estudos e exploração em campo (LEUNG *et al.*, 2020; DA SILVA SANTOS *et al.*, 2020).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar e identificar possíveis agentes fúngicos entomopatogênicos para o controle de pragas agrícolas, visando avaliar seu potencial como agente biocontrolador.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar patógeno fúngico de praga agrícola.
- Realizar estudos de revisão bibliográfica para descrever os patógenos fúngicos conhecidos para a espécie hospedeira.
- Testar tratamentos a partir de isolados entomopatogênicos de larvas de *Ephestia kuehniella* (Zeller) a fim de avaliar a taxa de mortalidade das mesmas

3. RESULTADOS

Os resultados dessa dissertação foram organizados em dois artigos científicos. O primeiro trabalho foi submetido à revista *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, sendo (Fator de impacto 2.4 e conceito B2 na Nova Avaliação Qualis Capes - 2019). O segundo será submetido à revista *Journal of the Entomological Research Society* (Fator de impacto 0.4).

3.1 Artigo 1:

Global review of fungal pathogens in *Agraulis vanillae* Linnaeus and *Dione juno* Cramer, with a new pathogen record for *A. vanillae* in Brazil

Foi submetido à Egyptian Journal of Biological Pest Control, ISSN: 2536-9342, fator de impacto: 2,4 e conceito B2 na Nova Avaliação Qualis Capes-2019.

Bibliographical review of the occurrence of pathogenic (entomopathogenic) fungi in *Agraulis vanillae* Linnaeus and *Dione juno* Cramer, and new pathogen record for the species in Brazil.

Revisão bibliográfica de ocorrência de fungo patogênico em *Agraulis vanillae* e *Dione juno* e novo registro de patógeno para a espécie no Brasil.

Guilherme Henrique Mueller¹, Cassiane Furlan Lopes¹, Fernando Augusto Bertazzo-Silva¹,
Kamille Rodrigues Ferraz¹, Andreas Kohler², Jair Putzke¹

Universidade Federal do Pampa¹

Universidade de Santa Cruz do Sul²

Resumo: *Agraulis vanillae* Linnaeus, 1758 e *Dione juno* Cramer, 1779 (Insecta: Lepidoptera: Nymphalidae) são considerados insetos praga para a cultura do maracujazeiro (*Passiflora edulis* – Passifloraceae). Embora essas espécies sejam de grande interesse econômico em consequência de seus danos, ainda são escassos os registros de doenças fúngicas que as acometem. Dessa forma, com o objetivo de se identificar fungos capazes de infectar *A. vanillae* e *D. juno*, além de verificar as principais pesquisas na área para ambos os insetos, busca em bancos de dados eletrônicos, como PubMed, Scopus ou Web of Science, utilizando palavras-chave e termos relevantes ao tema em questão, a fim de localizar novos patógenos fúngicos de insetos-praga do maracujazeiro. Coletas de larvas de *Agraulis vanillae* infectadas com *Fusarium* sp. (Fungi: Hypocreales: Nectriaceae) foram realizadas na cidade de Vera Cruz, Rio Grande do Sul, Brasil. Dessa forma, a descrição taxonômica e as condições de cultivo deste fungo são caracterizadas neste trabalho como resultados da pesquisa. A descoberta pode gerar aplicações agrícolas, embora mais estudos testando o potencial e a efetividade de biocontrole de *Fusarium* sp. ainda necessitam ser realizados.

Palavras-chave: Biocontrole, Pragas do maracujá, Fungi, Revisão

1. Antecedentes

Maracujá e maracujazeiro são termos referentes à diferentes espécies da família Passifloraceae, todas do gênero *Passiflora* (Faleiro et al., 2018). São plantas trepadeiras herbáceas ou lenhosas, presas a suportes por gavinhas (Lunz et al., 2006). O maracujá é uma fruta de interesse econômico, altamente nutritiva e com valor medicinal, é consumida *in natura* ou usada na fabricação de sucos (Thokchom & Mandal, 2017). A espécie mais cultivada é o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.), sendo o Brasil o maior produtor mundial, comercializando no mercado interno e também exportado (Lima et al., 2006; Faleiro et al., 2018). A cultura do maracujá pode ser atacada por diferentes espécies de insetos, entretanto duas espécies de lagartas desfolhadoras se destacam como pragas por sua frequência, principalmente em períodos secos do ano (Lunz et al., 2006; Lima et al., 2006).

Dentre estas, *Dione juno* Cramer, 1779 (Insecta: Lepidoptera: Nymphalidae) apresenta distribuição por toda América Central, grande parte da América do Sul e Antilhas Menores (Tavares et al. 2002). As larvas dessa espécie apresentam coloração amarelada, alternando para pardo escuras ao longo do seu desenvolvimento, além disso, suas asas posteriores possuem manchas pardas e na fase adulta as asas anteriores são alaranjadas, com as margens externas pretas (Machado et al., 2017). A oviposição é realizada preferencialmente na face abaxial das folhas, sendo os ovos agrupados em número de 60 a 140 (Machado et al. 2017; Tavares et al. 2002).

Bianchi & Moreira (2005) relatam a adaptabilidade de *Dione juno* ao consumir diferentes espécies de *Passiflora*, a preferência de consumo de larvas recém-eclodidas e de

quinto instar é direcionada para o genótipo de *P. edulis* em relação à outros genótipos de passifloráceas. *D. juno* merece destaque por incidir durante todo o ano no cultivo do maracujá e em função dos danos causados em consequência das larvas possuem comportamento gregário, ocasionando maior consumo da planta (Tavarez 2002; Angelini *et al.* 2007). Em plantas jovens os danos podem ser mais severos uma vez que as larvas podem causar desfolhamento total, além de poder raspar a casca dos ramos do maracujazeiro (Lima *et al.* 2006).

Por outro lado, *Agraulis vanillae* Linnaeus, 1758 (Insecta: Lepidoptera: Nymphalidae) é uma espécie de borboleta que durante sua fase jovem é uma lagarta de hábito solitário. Sua distribuição é neotropical, ocorrendo desde o sul dos Estado Unidos, Índias ocidentais até o norte da Argentina e Uruguai (da Silva *et al.*, 2006). Na fase adulta, se destaca por sua coloração alaranjada nas asas com manchas negras enquanto a fase larval logo no início do seu ciclo é descrita com coloração branco-pardacento, tornando ao final do ciclo amarelo-escuras com duas faixas laterais marrons e corpo recoberto por espinhos pretos (da Silva *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2017).

Espécies de *Agraulis* são reconhecidas pela sua relação com o maracujazeiro (*Passiflora edulis*) e desde a década de cinquenta sua predação é citada como danosa às folhas da planta, reduzindo sua área fotossintética (Lordello, 1954).

Estudos sugerem uma coevolução de borboletas herbívoras e suas plantas alvo: as lagartas da tribo Heliconiini (Nymphalidae) que nesse sentido, são muito bem adaptadas ao maracujazeiro, apresentando grande especificidade entre inseto e planta, como exemplo, as fêmeas de *A. vanillae* que depositam seus ovos nas espécies de *Passiflora* mais propícias ao crescimento e desenvolvimento larval (Chopp & Davenport, 1978a). A oviposição é gerida por “pistas” químicas ativadas por contato, sendo o nível de infestação relacionado ao equilíbrio de compostos apresentados por espécies de *Passiflora*, assim, a população que permanece na

planta depende da taxa de oviposição e da taxa de mortalidade das larvas (Chopp & Davenport, 1978b).

Existem vários meios para se fazer o controle das duas espécies: em culturas pequenas recomenda-se a catação manual dos ovos das lagartas mas em culturas maiores se torna inviável a catação, além de ineficiente (Lunz et al. 2006). O controle das pragas pode ser feito por uso de agrotóxicos, porém o uso indiscriminado pode acarretar em desequilíbrio ecológico ao eliminar não apenas a espécie praga alvo, mas outros organismos vertebrados e invertebrados (de Lima & Veiga 1995). Outras consequências seriam problemas de saúde para o aplicador do agrotóxico e principalmente do consumidor final do produto (Ali et al., 2021). Os problemas envolvendo o uso de agrotóxicos estimularam pesquisas para descobrir meios de controle biológico, sendo atualmente estimulado o uso de bactérias, vírus e de parasitóides (De Lima & Veiga, 1995; Machado et al., 2017).

Insetos que podem atuar como controladores biológicos são comuns na família dos ninfalídeos, dentre o gênero *Agraulis* pode-se citar a predação de larvas por *Polistes* sp. (Hymenoptera) e o parasitismo em pupas por *Spilochalcis* spp. (Hymenoptera) (de Lima & Veiga, 1995). Atualmente o controle de *Dione juno* e *Agraulis vanillae* se utiliza *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e *Baculovirus dione* (NPV) enquanto outras estratégias apostam em parasitóides como *Trichogramma* (Hymenoptera) (Machado et al., 2017). Um dos grupos de microrganismos que vem ganhando destaque pelo seu potencial de controle biológico são os fungos, sendo *Trichoderma* e *Metarhizium* utilizadas como inseticidas microbianos (da Silva & Malta 2016).

Nesse sentido, esse trabalho possui o objetivo de realizar uma revisão bibliográfica de patógenos fúngicos encontrados em *Dione juno* e *Agraulis vanillae* e de relatar um novo agente infeccioso para *A. vanillae*.

Metodologia

Revisão bibliográfica

As buscas foram realizadas nas plataformas: Google Scholar (<https://scholar.google.com.br>) e Web of Science (<https://clarivate.com>) com as palavras-chave: 'Dione juno and Fungi', 'Dione juno e Entomopatogênico', 'Agraulis vanillae e Fungos', 'Agraulis vanillae e Entomopatogênico'. Foram selecionados artigos publicados entre os anos de 1964 e 2022, período estabelecido para listar fungos entomopatogênicos nessas espécies. Monografias, dissertações e teses foram excluídas da busca.

Com o objetivo de conjecturar quais eram os principais temas de pesquisa envolvendo *D. juno* e *A. vanillae*, utilizou-se o software VOZviewer 1.6.19 para criar um mapa bibliométrico de palavras-chave. Os termos “*Agraulis vanillae*” e “*Dione juno*”, “*Dione juno* ou *Agraulis vanillae*” foram utilizados a partir de registros na Web of Science (<https://clarivate.com>). Para encontrar palavras-chave expressivas para criar um mapa mais claro, foram escolhidas apenas palavras-chave com pelo menos duas ocorrências nos artigos encontrados.

Coleta, isolamento fúngico e taxonomia

Uma larva de *Agraulis vanillae* foi coletada sob folhas de *Passiflora edulis* recoberta por micélio fúngico em abril de 2022 no município de Vera Cruz - RS em área residencial (-29.720074, -52.497462). O fungo foi isolado a partir do crescimento micelial da larva coletada e cultivado em meio sabouraud em placas de Petri. O isolado foi repicado a cada 15

dias sendo mantido à 26 °C (\pm 2°C) em temperatura ambiente e sem incidência de luz no Laboratório de Taxonomia de Fungos, em São Gabriel - RS (UNIPAMPA).

Para identificação taxonômica, foram confeccionadas lâminas a partir de fragmentos do cultivo isolado para visualização em microscópio óptico Zeiss ACT0. Onde se identificou o isolado como *Fusarium* sp. a partir de Nelson et al. (1990).

Confirmação da entomopatogenicidade de *Fusarium* sp.

Testes de entomopatogenicidade foram realizados seguindo metodologia proposta pelo postulado de Koch, sendo um modelo reconhecido para se confirmar os agentes primários de uma doença em plantas ou animais (Gentry et al., 2021). As etapas descritas são: isolamento do patógeno diretamente do hospedeiro original, registro do agente infeccioso causando os mesmos sintomas em novos hospedeiros e por fim um novo isolamento do hospedeiro recém infectado em virtude da confirmação do patógeno (Koch, 1884).

Assim, do isolado fúngico da primeira lagarta de *Agraulis vanillae*, se obteve uma cultura axênica do patógeno. Houve coletas no mesmo local onde o primeiro inseto foi encontrado e mais três lagartas saudáveis foram obtidas. Esses indivíduos foram colocados sobre o isolado fúngico em placas de Petri e foi observado o efeito do isolado sobre as mesmas. As novas larvas infectadas foram incubadas em meio sabouraud com o objetivo de isolar o patógeno novamente (Ramakuwela et al., 2020 modificado)

Resultados

Revisão bibliográfica

Foram encontrados 270 resultados para *D. juno* onde 7 desses eram trabalhos duplicados. Para *A. vanillae* foram encontrados 254 resultados, destes 6 eram trabalhos duplicados. Dos trabalhos registrados para *A. vanillae*, apenas dois foram condizentes com o objetivo da pesquisa.

Hospedeiro	Fungo	País	Reference
<i>Agraulis vanillae insularis</i>	<i>Akanthomyces lecanii</i> (anteriormente <i>Lecanicillium lecanii</i>)	Cuba	Escandón-Arbolay M. C., et al., 2013
<i>Agraulis vanillae</i>	<i>Cordyceps tenuipes</i> (anteriormente <i>Isaria tenuipes</i>)	Colômbia	L. A. Castrillo., 2020
<i>Dione juno</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	Peru	Malpartida-Zevallos, J., et al., 2013

Tabela 1. Fungos patógenos de *Agraulis vanillae* e *Dione juno* citados em estudos avaliados por pares.

Mapas bibliográficos de palavras-chave

A pesquisa realizada resultou em três mapas bibliográficos distintos. Os mapas são organizados a partir de suas palavras-chave, juntas essas formam agrupamentos sobre um tema e se diferenciam pela coloração. Referente à pesquisa feita com a palavra ‘*Agraulis vanillae*’ gerou a figura 1, o mesmo ocorreu para a pesquisa feita com ‘*Dione juno*’ (figura 2).

O mapa bibliográfico de *A. vanillae* contém quatro agrupamentos como demonstrado na figura 1: O grupo vermelho destaca palavras como ‘butterfly’, ‘diversification’, ‘genetic diversity’, ‘evolution’, ‘genera’, ‘diversity’, e ‘nymphalids lepidoptera’; em amarelo surge

com palavras ‘pirrolizidine alkaloids’, ‘toxic nectar’, ‘*ithomiine butterflies*’, ‘*heliiconiae*’, ‘behavior’ e ‘pollination’; um terceiro grupo em azul é organizada pelas palavras: ‘insects’, ‘genes’, ‘methyl jasmonate’, ‘passion fruit’, ‘plant-leaves’, ‘herbivory’ e ‘ultrastructure’; o último agrupamento (verde) conecta as palavras: ‘*Agraulis vanillae*’, ‘nectar’, ‘lepidoptera’, ‘migration’, ‘north-america’, ‘*phoebis sennae*’, ‘urbanus proteus’ e ‘phenology’.

Os grupos formados para *D. juno* são expostos na figura 2. Em vermelho apresentam-se as palavras: ‘*Agraulis vanillae*’, ‘gene’, ‘protein’, ‘baculoviruses’ e ‘ultrastructure’; as palavras apresentadas no grupo azul são: ‘lepidoptera’, ‘identification’, ‘genome sequence’ e ‘larval’; Em amarelo temos o menor agrupamento associado pelas palavras: ‘passion fruit’ e ‘*Passiflora edulis*’; A última formação em verde contém as palavras: ‘dione juno’, ‘evolution’, ‘heliconian butterflies’, ‘passifloraceae’ e ‘flavonoids’.

O terceiro mapa gerado (figura 3) mostra em retrospectiva as palavras-chave citadas com o passar dos anos para as duas espécies.

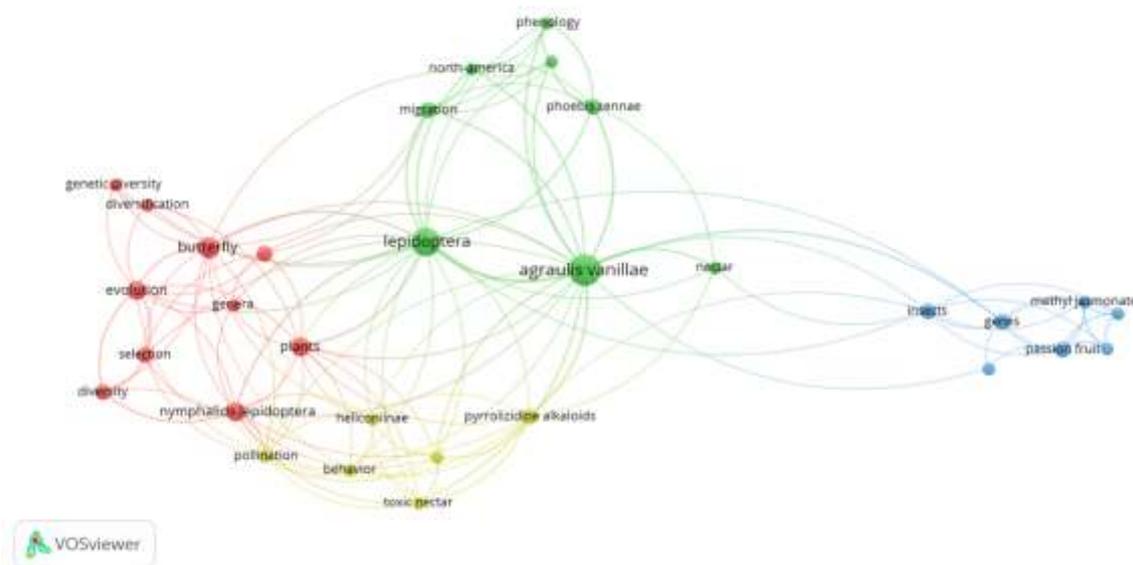


Figura 1. Mapa bibliográfico de palavras-chave ligadas à espécie '*Agraulis vanillae*'

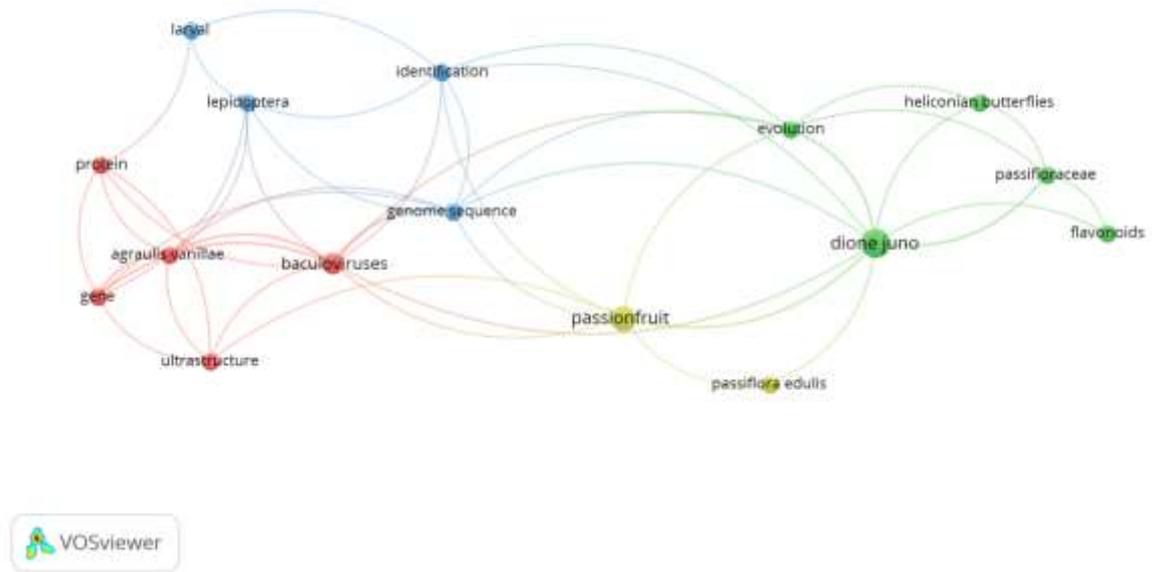


Figura 2. Mapa bibliográfico de palavras-chave ligadas à espécie '*Dione juno*'.

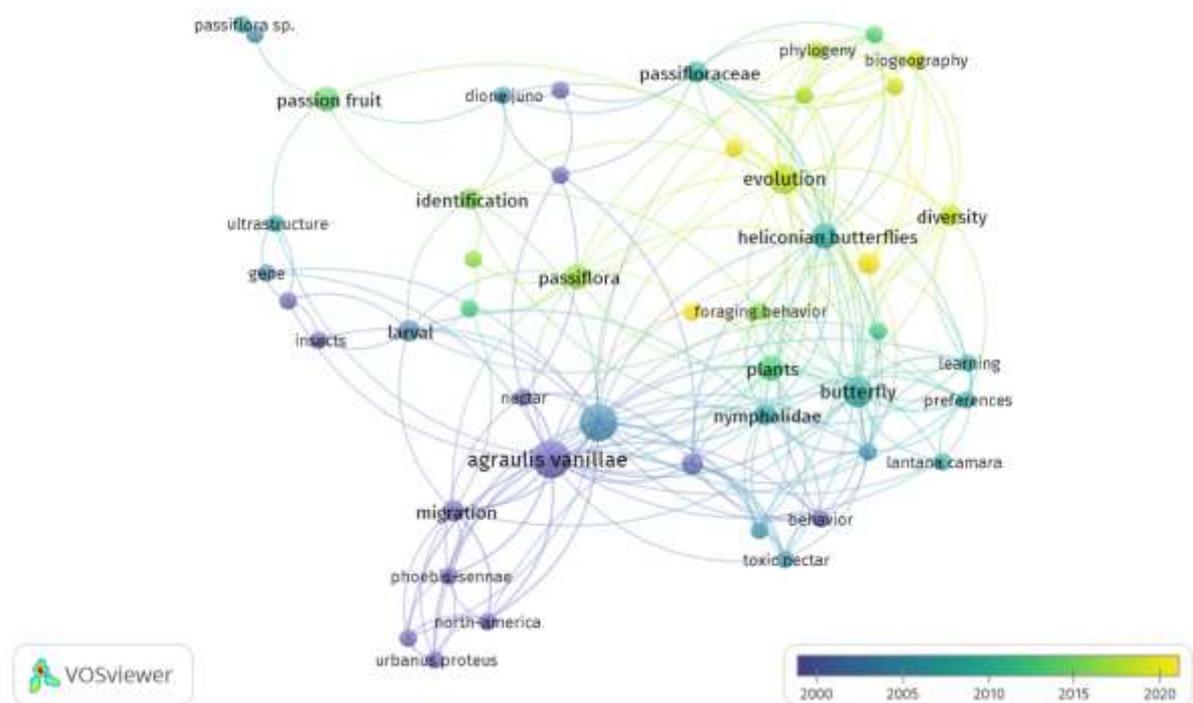


figura 3. Mapa bibliográfico para ‘*Agraulis vanillae* or *Dione juno*’ e mudança das palavras-chave com o decorrer do tempo

Resultado e novo registro

As colônias em meio saburound (indicada na figura 4A) tiveram crescimento radial em 7 dias tendo um crescimento de 3.5cm - 4 cm. A altura do micélio aéreo foi de 0.5 mm (mais baixo) 3.4 mm (mais alto) em 30 dias possuindo coloração branca (vista superior) enquanto a coloração vista por baixo apresentou tom claro de marrom variando para laranja. Conidióforo com monofiálides e polifiálides produzindo macroconídios e microconídios. Os conídios do micélio aéreo se caracterizam pela presença de macroconídios não marcados dorsoventralmente, mantendo sua curvatura reta ao longo do esporo, células basais em formato de pé ou dentado, relativamente fino com paredes celulares finas, célula basal com curvatura notável, septação de 1-7 septos: 1-septos: (10)11,25 - 18(24) X (2) 2 - 2,12(2.5) μm ,

2-septos: (16)16 - 23(26) X (2)2 - 3,5(4) μm , 3-septos: (18)20- 28,5(30) X (2)2 - 4(4) μm , 4-septos:(20) 20,5 - 30,5(32) X (2)2 - 4(4) μm , 5-septos: (20)21 - 30,5(36), 6-septos: (22)22,5 - 31,25(33) X (2)2 - 4(4) μm , 7-septos: (22)23 - 30(30) X (2)2 - 4(4) μm . Já os microconídios, estavam presentes e abundantes, apresentando formato oval variando para reniforme clavado. Clamidósporo também presentes, sozinhos e esparsos.

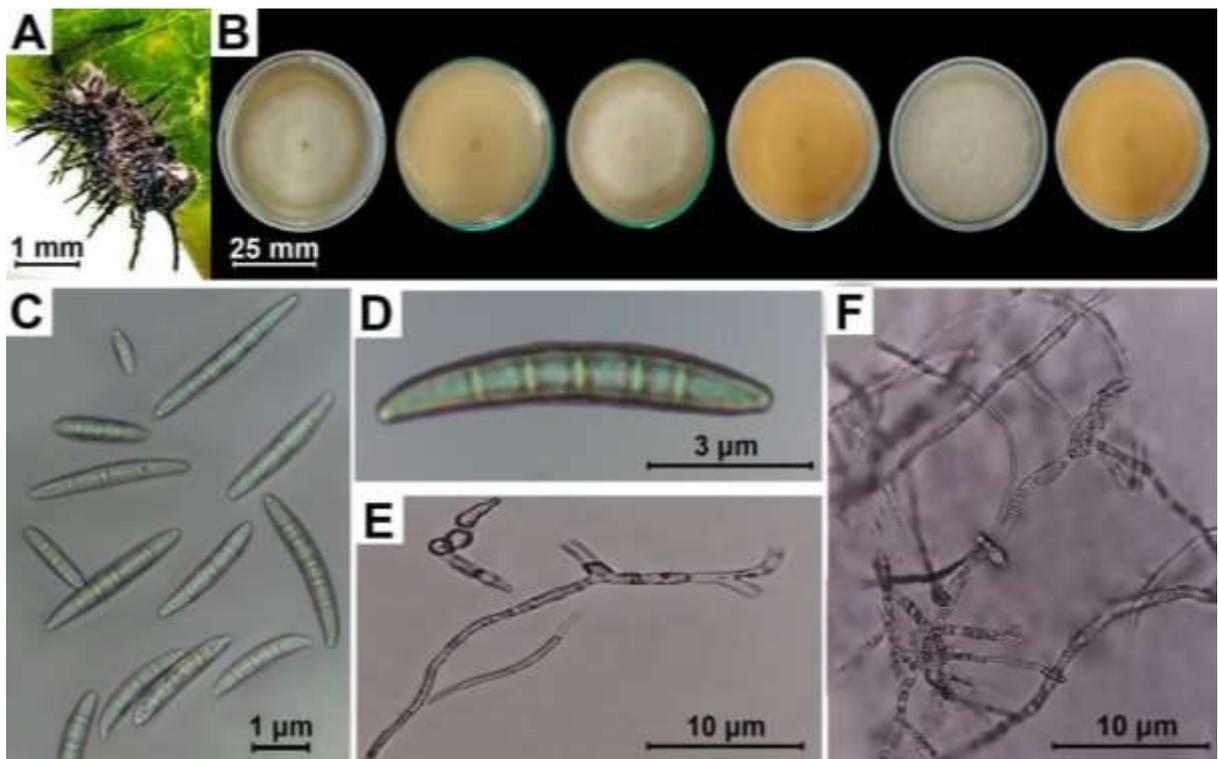


Figura 4. A. Lagarta de *Agraulis vanillae* infestada por patógeno fúngico. B. Da esquerda para a direita vista superior e inferior de três placas de isolados de *Fusarium* sp. crescendo em meio sabouraud durante 30 dias. C Microconídios e macroconídios septados. D. Macroconídio. E. Clamidósporo F. Micélio aéreo.

Teste seguindo postulado de Koch:

Observou-se que o fungo paralisou as lagartas de *A. vanillae* em cerca de 4 horas após exposição, sendo que os insetos foram completamente tomadas pelo micélio três dias após o

início da observação. Dos novos cultivos gerados com a reinfecção das lagartas se obteve uma nova cultura de *Fusarium* sp., confirmando-o como patógeno.

Discussão

Como é possível verificar na tabela 1, a nota mais antiga sobre infecções fúngicas levantadas em *Agraulis vanillae*, houve uma descrição na ilha de Cuba, sendo o fungo citado *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams 2001, dentre os sintomas observados em lagartas foram perda de apetite, fraqueza e desorientação, com perda da coloração, respectivamente (Escandón-Arbolay et al. 2013). *L. lecanii* foi atualizado para o gênero *Akanthomyces* em 2017, sendo descoberto por Nivter em 1861 no atual Sri Lanka (Jiang & Wang, 2023). É um patógeno bem difundido comercialmente, sendo usado principalmente em estufas de plantas (Jiang & Wang, 2023). Na Índia são registrados ao menos 60 produtos à base de *A. lecanii*, em formulações secas ou líquidas, sendo considerado o micoinseticida mais eficiente contra pulgões (Kumar et al., 2019).

O último registro, citado para Colômbia, relata a pupa de *Agraulis vanillae* infectada com o fungo *Isaria tenuipes* Peck 1878 (Castrillo, 2020). Atualmente esse foi realocado para o gênero *Cordyceps* (Jiang & Wang, 2023). Em trabalho tendo como alvo lagartas de *Aedes aegypti*, transmissor da dengue, *I. tenuipes* já tratada como *Cordyceps tenuipes* demonstrou ter uma boa eficácia, possuindo efeito de reduzir os índices de algumas enzimas responsáveis pela resistência das pragas contra toxinas químicas somada a sua atividade não tóxica para predadores aquáticos (Karthi et al., 2020).

Enquanto para *Dione juno*, houve apenas um achado, em experimento para testar mortalidade de lagartas em contato com *Beauveria bassiana*, um fungo já reconhecido pelo seu controle de lepidópteros e coleópteros (Malpartida-Zevallo et al.; 2013). Os testes

identificaram que larvas de terceiro ínstar de *Dione juno* foram suscetíveis à *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. 1912, discutindo o possível uso de *B. bassiana* para o manejo integrado da praga em campo (Malpartida-Zevallo et al., 2013). A espécie se destaca pela presença de metabólitos secundários e pequenos compostos moleculares com atividade inseticida ampla contra a maioria das pragas agrícolas, sendo a baveuricina uma de suas toxinas mais relevantes (Wang et al., 2021). A infecção no inseto varia do estado fisiológico do mesmo, e o entendimento é de que a toxicidade é o resultado de mais de um dos compostos secretados pelo fungo interferindo assim na sua patogenicidade conforme hospedeiro (Wang et al., 2021).

Como exposto em cada mapa bibliométrico, a discussão se baseia em temas de interesses distintos. Na figura 1 o grupo em vermelho revela palavras que são relativas à evolução e diversidade do taxon Lepidoptera. Kristensen et al. (2007) levanta que os estudos de Lepidoptera podem ser mais dificultosos que de outros insetos, fundamentado principalmente em sua monofilia bem estabelecida por grupos mais basais, sendo muito semelhantes estrutural e ecologicamente, mesmo que haja uma diversidade muito grande de espécies. As palavras-chave em amarelo se referem à polinização e sobre a influência de néctar com compostos que dissuadem ou inibem a alimentação de insetos, como alcalóides e compostos fenólicos (Landolt & Lenczewski, 1993). O terceiro grupo de palavras é referente à herbívora. O tema foi discutido em estudos que exploraram o potencial de compostos ou genes capazes de inibir o consumo de plantas como o caso do maracujazeiro enquanto outros trabalhos desenvolveram a relação do desenvolvimento e mortalidade de lagartas de heliconíneos com suas plantas hospedeiras (Bianchini & Moreira, 2005; Botelho et al., 2008; Borges et al., 2013). O quarto cluster em verde representa trabalhos que abrangem a fenologia e migração de lepidópteros, explorando seus padrões sazonais, números de migrantes e espécies relacionadas (Walker, 2001).

A organização dos grupos conectados na figura 2 destaca outras palavras para a espécie *D. juno*, e em vermelho são expostos os trabalhos com viroses, como baculoviroses que estão entre os grupos mais diversos. Sendo já conhecido sua interação com famílias de Lepidoptera e que podem coevoluir com sua população hospedeira de forma menos virulenta, se especializando a hospedeiros específicos ou em casos extremos pode causar especiação com seu hospedeiro (Herniou & Jehle, 2008). Outros trabalhos em foco em azul são caracterização discricionária de marcadores genéticos e estudos taxonômicos, sendo a linhagem dos heliconius uma das mais bem descritas e estudadas (Massardo et al., 2012). A formação em amarelo é relacionada à interação de *Dione juno* às espécies de maracujá, comentando sobre atratividade dos insetos para genótipos distintos (Angelini & Junior, 2007), além de resistência e suscetibilidade de espécies de *Passiflora* para com *D. juno*. (Junior et al., 2008). Por outro lado, a formação em verde de *D. juno* trata sobre trabalhos que continuam explorando a relação de *D. juno* com o maracujá, como à exemplo de testes de flavonoides para controle do inseto (Echeverri et al., 1991), o agrupamento contém estudos explorando a biologia de nymphalideos e sua diversidade, com descrição genética e taxonomia que configuram *Dione* como uma linhagem independente e irmã de *Agraulis*, discutindo suas estruturas e marcadores genéticos (Massardo et al. 2015).

Em relação ao desenvolvimento das pesquisas ao longo do tempo, nota-se que no início dos anos 2000 os estudos desenvolvidos são em relação à descrição taxonômica e genética das espécies dos insetos. Posteriormente em 2010 os temas passam a dar enfoque em comportamento e interatividade com espécies de maracujá, seguido de estudos de controle biológico. Em trabalhos mais recentes a especiação e diversidades são temas discutidos, enquanto se progrediu estudos da relação desses insetos com as passifloráceas, de preferências inatas e influência de sua morfologia (Drewniak et al. 2020).

A associação entre fungos e as pragas de maracujá como área de estudos ainda é atípica. Como demonstrado com os mapas bibliográficos, as pesquisas mais regulares entre *D. juno* e *A. vanillae* são taxonômicas, ecológicas e envolvidas direta ou indiretamente com a cultura do maracujazeiro.

O crescimento dos trabalhos em biocontrole traz a potencialidade de maiores investigações da interação entre fungos e insetos (da Silva & Malta, 2016). Posto que *D. juno* e *A. vanillae* atacam com maior regularidade a cultura do maracujá, mas se é registrado ao menos doze espécies de lepidópteros causadores de danos, sendo oito pertencentes à *Nymphalidae* (Lunz et al. 2006).

Atualmente a relação mais bem descrita para o controle biológico desses insetos é por meio de sua predação ou por controle a partir de parasitóides, desde trabalhos relatando a coleta e identificação de inimigos naturais ou a testes realizados em laboratório, como o modelo utilizando *Palmistichus elaeisis* implementando sua possível criação *in vitro* em *A. vanillae* (Lima & Veiga 1995) (Rodríguez-Dimaté et al. 2016). Um dos desafios para a demanda de comida é a de inovações tecnológicas para a proteção de colheitas enquanto se conserva os recursos naturais, ademais é possível que a técnica de controle biológico seja uma das que mais retorne o seu investimento dentro do Manejo Integrado de Pragas (Naranjo et al., 2015). Outros benefícios precisam ser acompanhados ao longo do tempo, como programas clássicos de controle já bem sucedidos reduzindo os danos econômicos, por redução dos impactos da praga e despesas com práticas alternativas de controle (Naranjo et al., 2015).

O gênero *Fusarium* é bem difundido na natureza podendo apresentar hábito sapróbio ou associado à plantas e animais (Teetor-Barsch & Roberts 1983). Conhecido por possuir metabólitos tóxicos e causar mazelas em seus hospedeiros, em insetos, *Fusarium* possui associações patogênicas e não patogênicas (Teetor-Barsch & Roberts, 1983) (Santos et al. 2020). A patogenicidade de *Fusarium* já foi atestada para várias ordens de insetos e sua

interação é mais diversa do que se concluía em trabalhos anteriores, mas poucos estudos exploram sua especificidade com o hospedeiro, ou efeitos em organismos não-alvos (Santos et al. 2020). Quanto à sua associação com organismos de Lepidoptera, *Fusarium* causa taxa de mortalidade baixa em testes de patogenicidade, apesar de ser a segunda ordem de insetos com mais estudos registados (Santos et al. 2020). Outra relação já discutida para justificar os baixos níveis de infecção em lagartas é a infecção por *Fusarium* de forma acidental quando larvas com cutículas já danificadas entram em contato com o fungo, infectando posteriormente as folhas de plantas consumidas por esses insetos (Hajek et al., 1993).

Os inseticidas geralmente são o grupo mais tóxico dentre os pesticidas, se acumulando em cadeias alimentares naturais, sendo consumidos em alimentos ou na água (Ali et al., 2021). A eficácia do controle biológico não se faz apenas pela mortalidade dos insetos, mas também leva em conta a inibição do herbivorismo sobre cultura afetada, nesse sentido ainda se é discutido a substituição dos inseticidas químicos pelos patógenos microbianos (Tefera & Pringle, 2003). Acredita-se que a virulência de patógenos fúngicos podem ser maiores em insetos sem uma infecção prévia (Mantzoukas et al. 2022).

Para alcançar sistemas mais sustentáveis e redução de impacto em insetos não-alvo é necessária a adição e desenvolvimentos na área de biotecnologia, sendo pesticidas baseados em fungos passíveis de serem modificados para atender determinadas compatibilidade com insetos alvos através da adesão de marcadores ou silenciadores genéticos (Naranjo et al., 2015; Mantzoukas et al. 2022).

Os resultados sugerem *Fusarium sp.* como um novo agente infeccioso fúngico para *A. vanillae*. Entretanto mais estudos devem ser realizados a fim de tornar viável sua utilização em culturas de *Passiflora sp.*

Conclusão

Os estudos em torno de patógenos fúngicos para as espécies *Dione juno* e *Agraulis vanillae* ainda são incipientes, sendo registrado até o momento patógenos bem conhecidos por atacar outros grupos de insetos ou já utilizados na indústria de inseticidas biológicos.

Fusarium sp. é um novo registro para *Agraulis vanillae*, sendo um fungo com potencial de controle biológico. Entretanto, torna-se necessário realizar mais estudos sobre o patógeno isolado, bem como explorar novas espécies para o controle das espécies pragas de maracujá visando substituir inseticidas químicos.

Referências

Ali, S., Ullah, M. I., Sajjad, A., Shakeel, Q., & Hussain, A. (2021). Environmental and Health Effects of Pesticide Residues (pp. 311–336). https://doi.org/10.1007/978-3-030-54719-6_8

Angelini, M. R., & Boiça Júnior, A. L. (2007). Preferência alimentar de *Dione juno juno* (CRAMER, 1779)(Lepidoptera: Nymphalidae) por genótipos de maracujazeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29, 276-281.

Botelho, S., Siqueira, C. L., Jardim, B. C., Machado, O. L. T., Neves-Ferreira, A. G. C., Perales, J., & Jacinto, T. (2008). Trypsin inhibitors in passion fruit (*Passiflora f. edulis flavicarpa*) leaves: Accumulation in response to methyl jasmonate, mechanical wounding, and herbivory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(20), 9404–9409.

<https://doi.org/10.1021/jf8013266>

Copp, N. H., & Davenport, D. (1978a). AGRAULIS AND PASSIFLORA I. CONTROL OF SPECIFICITY. *The Biological Bulletin*, 155(1), 98–112. <https://doi.org/10.2307/1540868>

Copp, N. H., & Davenport, D. (1978b). AGRAULIS AND PASSIFLORA II. BEHAVIOR AND SENSORY MODALITIES. *The Biological Bulletin*, 155(1), 113–124. <https://doi.org/10.2307/1540869>

da Silva, C. J. A., & do Nascimento Malta, D. J. (2016). A importância dos fungos na biotecnologia. *Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-PERNAMBUCO*, 2(3), 49-49.

de Lima, M. de F. C., & de SL Veig, A. F. (1995). OCORRÊNCIA DE INIMIGOS NATURAIS DE *Dione juno juno* (CR.), *Agraulis vanillae* maculosa S. E *Eueides isabelia* dianasa (HTJB.) (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE) EM PERNAMBUCO. *An. Soc. Entomol. Brasil* .

Drewniak, M. E., Briscoe, A. D., Cocucci, A. A., Beccacece, H. M., Zapata, A. I., & Moré, M. (2020). From the butterfly's point of view: learned colour association determines differential pollination of two co-occurring mock verbains by *Agraulis vanillae* (Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, XX, 1–11. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa066/5861309>

Echeverri, F., Cardona, G., Torres, F., Pelaez, C., Quions, W., & Renteria, E. (1991). PASSIFLORA FOETIDA RESIN (Vol. 55).

Escandón-Arbolay, M. C., Díaz-Viruliche, L., & Castro-Lizazo, I. (2013). *Lecanicillium lecanii* (Zare y Gams) parasitando larvas de *Agraulis vanillae* insularis Maynard. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 78.

Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Junghans, T. G., de Jesus, O. N., Miranda, D., & Otoni, W. C. (2019). Advances in passion fruit (*Passiflora* spp.) propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41(2). <https://doi.org/10.1590/0100-29452019155>

Gentry, S. L., Lorch, J. M., Lankton, J. S., & Pringle, A. (2021). Koch's postulates: Confirming *Nannizziopsis guarroi* as the cause of yellow fungal disease in *Pogona vitticeps*. *Mycologia*, 113(6), 1253–1263. <https://doi.org/10.1080/00275514.2021.1954445>

Hajek, A. E., Nelson, P. E., Humber, R. A., & Perry, J. L. (1993). Two *Fusarium* Species Pathogenic to Gypsy Moth, *Lymantria Dispar*. *Mycologia*, 85(6), 937–940. <https://doi.org/10.1080/00275514.1993.12026355>

Herniou, E. A., & Jehle, J. A. (2007). Baculovirus Phylogeny and Evolution. In *Current Drug Targets* (Vol. 8).

Jiang, Y., & Wang, J. (2023). The Registration Situation and Use of Mycopesticides in the World. In *Journal of Fungi* (Vol. 9, Issue 9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/jof9090940>

Júnior, A. L. B., Angelini, M. R., & de Oliveira, J. C. (2008). ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *DIONE JUNO JUNO* (CRAMER)(LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE) EM GENÓTIPOS DE MARACUJAZEIRO1. *Rev. Bras. Frutic.*, 30(1).

Koch, R. (1878). Untersuchungen über die Etiologie der Wundinfectionskrankheiten. Vogel.

Kristensen, N. P., Scoble, M. J., & Karsholt, O. (2007). Lepidoptera phylogeny and systematics: the state of inventorying moth and butterfly diversity. *Zootaxa*, 1668, 699–747.

Kumar, K. K., Sridhar, J., Murali-Baskaran, R. K., Senthil-Nathan, S., Kaushal, P., Dara, S. K., & Arthurs, S. (2019). Microbial biopesticides for insect pest management in India: Current status and future prospects. In *Journal of Invertebrate Pathology* (Vol. 165, pp. 74–81). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.10.008>

Landolt, P. J., & Lenczewski, B. (1993). Lack of Evidence for the Toxic Nectar Hypothesis: A Plant Alkaloid Did Not Deter Nectar Feeding by Lepidoptera. In *Source: The Florida Entomologist* (Vol. 76, Issue 4).

LIMA, A. de A., NORONHA, A. C. da S., Borges, A. L., Cardoso, C. E. L., Ritzinger, C. H. S. P., BARBOSA, C. de J., COSTA, D. da C., Santos Filho, H. P., Francelli, M., CUNHA, M. A. P. da, & Sanches, N. F. (2006). A cultura do maracujá. Embrapa Informação Tecnológica.

Lunz Mehl, A., Lindaurea, L., de Souza, A., De, W., & Lemos, P. (2006). Reconhecimento dos Principais Insetos-Praga do Maracujazeiro.

Lordello, L. G. E. (1954). INSETOS QUE VIVEM SÔBRE O MARACUJAZEIRO: III-NOTAS ACÊRCA DE *Dione Juno* (CRAMER)(LEP. NYMPHALIDAE) E RELAÇÃO DE ALGUNS OUTROS INSETOS HABITUALMENTE COLIGIDOS DE *Passiflora* SPP. BRAZILIAN JOURNAL OF AGRICULTURE-Revista de Agricultura, 29(1–2), 23–29.

Machado, C. D. F., Faleiro, F. G., Santos Filho, H. P., Fancelli, M., Carvalho, R. D. S., Ritzinger, C., ... & de Novaes, Q. S. (2017). Guia de identificação e controle de pragas na cultura do maracujazeiro.

Mantzoukas, S., Kitsiou, F., Lagogiannis, I., & Eliopoulos, P. A. (2022). Potential Use of Fusarium Isolates as Biological Control Agents: *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) Case Study. Applied Sciences (Switzerland), 12(17).
<https://doi.org/10.3390/app12178918>

Massardo, D., Roratto, P. A., Vargas, H. A., Kronforst, M. R., & Moreira, G. R. P. (2012). Development of a microsatellite library for the passion flower butterfly *Dione moneta* Hübner (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae). Conservation Genetics Resources, 4(3), 719–724.
<https://doi.org/10.1007/s12686-012-9630-9>

Massardo, D., Fornel, R., Kronforst, M., Gonçalves, G. L., & Moreira, G. R. P. (2015). Diversification of the silverspot butterflies (Nymphalidae) in the Neotropics inferred from multi-locus DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, 82(PA), 156–165.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.09.018>

Naranjo, S. E., Ellsworth, P. C., & Frisvold, G. B. (2015). Economic value of biological control in integrated pest management of managed plant systems. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 60, pp. 621–645). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021005>

Ramakuwela, T., Hatting, J., Bock, C., Vega, F. E., Wells, L., Mbata, G. N., & Shapiro-Ilan, D. (2020). Establishment of *Beauveria bassiana* as a fungal endophyte in pecan (*Carya illinoensis*) seedlings and its virulence against pecan insect pests. *Biological Control*, 140. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104102>

Rodríguez-Dímaté, F. A., Poderoso, J. C. M., Ribeiro, R. C., Brügger, B. P., Wilcken, C. F., Serrão, J. E., & Zanuncio, J. C. (2016). *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) Parasitizing Pupae of the Passion Fruit Pest *Agraulis vanillae vanillae* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Florida Entomologist*, 99(1), 130–132. <https://doi.org/10.1653/024.099.0127>

Santos, A. C. da S., Diniz, A. G., Tiago, P. V., & Oliveira, N. T. de. (2020). Entomopathogenic *Fusarium* species: a review of their potential for the biological control of insects, implications and prospects. In *Fungal Biology Reviews* (Vol. 34, Issue 1, pp. 41–57). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2019.12.002>

Silva, D. S. da, Dell’Erba, R., Kaminski, L. A., & Moreira, G. R. P. (2006). Morfologia externa dos estágios imaturos de heliconíneos neotropicais: V. *Agraulis vanillae maculosa* (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae). *Iheringia. Série Zoologia*, 96(2), 219–228. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212006000200013>

Tavares, M., Kaminski, L. A., & Moreira, G. R. (2002). Morfologia externa dos estágios imaturos de heliconíneos neotropicais: II. *Dione juno juno* (Cramer)(Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 19, 961-976..

Tector-Barsch, G. H., & Roberts, D. W. (1983). 9 Dr W. Junk Publishers, The Hague. Printed in The Netherlands. In *Mycopatbologia* (Vol. 84).

Tefera, T., & Pringle, K. L. (2003). Food consumption by *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae infected with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84(3), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.11.001>

Thokchom, R., & Mandal, G. (2017). Production preference and importance of passion fruit (*Passiflora edulis*): A review. *Journal of Agricultural Engineering and Food Technology*, 4(1), 27-30.

Walker, T. J. (2001). Butterfly migrations in Florida: Seasonal patterns and long-term changes. *Environmental Entomology*, 30(6), 1052–1060. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-30.6.1052>

Wang, H., Peng, H., Li, W., Cheng, P., & Gong, M. (2021). The Toxins of *Beauveria bassiana* and the Strategies to Improve Their Virulence to Insects. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705343>

3.2 Artigo 2:

Comparativo De Inóculo De *Fusarium* sp. e *Beauveria bassiana* contra Traça-da-farinha (*Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae))

Será submetido à revista Journal of the Entomological Research Society, ISSN (online): 2651-3579, fator de impacto: 0.4.

Comparativo De Inóculo De *Fusarium* sp. e *Beauveria bassiana* contra Traça-da-farinha (*Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae))

Guilherme Henrique MUELLER, Alice LEMOS COSTA, Andreas KÖHLER, Jair PUTZKE

RESUMO

Ephestia kuehniella Zeller é uma mariposa praga conhecida por causar danos em produtos estocados. Essa é uma espécie modelo para teste de novos microrganismos controladores de insetos. Testes com inseticidas à base de fungos tem crescido por ser uma alternativa mais ecológica para o mercado. Tendo isso em vista, aplicou-se um inseticida comercial à base do fungo *Beauveria bassiana* e testou-se também um tratamento à base de *Fusarium* sp., fungo isolado e cultivado *in vitro*. Equiparou-se as concentrações do produto comercial e de *Fusarium* sp., sendo testado mais três diluições do inóculo original. As larvas submetidas aos tratamentos mostraram sinais de fraqueza e maior taxa de mortalidade em comparação ao controle (água destilada). Tanto o tratamento à base de *B. bassiana* quanto *Fusarium* sp. mostraram-se efetivos contra larvas de *E. kuehniella*, criando potencial de novos estudos a cerca de biocontroladores fúngicos.

Palavras-chave: *Ephestia kuehniella*, *Fusarium*, *Beauveria bassiana*, taxa de mortalidade, controle biológico

INTRODUÇÃO

Produtos estocados podem sofrer diversos problemas relacionados com insetos-praga, esses problemas podem afetar instalações de processamento e moagem do alimento (Gerken & Campbell, 2022). Em áreas com produção intensa de grãos, insetos podem ser atraídos e ocasionar perdas econômicas, sendo que a

implementação de estratégias variadas de controle esta deve estar relacionada à proliferação desses insetos-pragas (Jian, 2019). Os danos podem ser diversos conforme o tipo e o tempo de estocagem, dentre eles estão reações alérgicas ao consumidor final, deterioração da qualidade do produto, além de perdas intangíveis relacionadas aos valores financeiros (Hui et al, 2003; Abd El-Aziz, 2011; Gerken & Campbell, 2022). A incidência de infestação por insetos aumenta durante as estações mais quentes do ano, principalmente devido ao ciclo reprodutivo dos mesmos (Jian, 2019).

Ephestia kuehniella Zeller, Pyralidae, é uma espécie popularmente conhecida como mariposa que se destaca em relação à deterioração de produtos armazenados (Trematerra et al., 2013). Esse inseto é considerado praga por ser um dos principais a atacar o trigo armazenado em moinhos, mas seus danos abrangem outros produtos armazenados, tais como cereais, sementes, nozes, frutas e folhas secas (kurtulus, 2020; Kılci, 2020; Güncan et al, 2023). *E. kuehniella* é uma espécie modelo em análises envolvendo a implementação de inseticidas controle, visando uma melhor gestão dessas pragas (Güncan et al, 2023). Devido a sua alta taxa de reprodução, *E. kuehniella* é muito utilizada para solução de problemas relacionados à estocagem desses produtos (Kılci, 2020). O grupo causa principalmente danos mecânicos devido à ocorrência da rede de teias e material fecal produzidas pelas larvas dessas mariposas (Ayvaz & Karabörklü, 2008; kurtulus, 2020). Além disso, problemas operacionais relacionados a contaminação dos alimentos, o surgimento de mofo e ranço provindo de contaminação em massa, torna o produto não comercializável, ou não aceitável para o consumidor final (Ayvaz & Karabörklü, 2008; Kılci, 2020; Güncan et al, 2023)

Normalmente, o tratamento da área infestada por esses insetos praga são dedetizadas com fumigantes como tetracloreto de carbono ou brometo de metila (Terziev & Petkova-Georgieva, 2020). Desta forma, compreender o estágio de vida dessas mariposas pode auxiliar em uma melhor compreensão dos parâmetros biológicos que influenciam sua sobrevivência (Günčan et al, 2023). Nessa premissa, o uso de inseticidas sintéticos podem causar danos ao meio ambiente e insetos não alvos, o que estimula a implementação de novos tratamentos livres de químicos. Nesta questão, produtos gerados a base de vírus, bactérias e fungos se mostram uma alternativa para o mercado (Rahman et al., 2023, Qin et al., 2023). Fungos são organismos de potencial bioinseticida, que são utilizados para o controle biológico, principalmente devido a presença de suas toxinas que podem infectar insetos por contato direto sem necessidade de ingestão (Rahman et al., 2023, Qin et al., 2023). Fungos do gênero *Fusarium* (Hypocreales) são organismos cosmopolitas e produzem metabólitos secundários, como micotoxinas tóxicas à animais (de HC Maciel et al., 2021). já foram descritos tendo ação rápida e esporulação abundante em insetos, tendo taxa de mortalidade variada relacionada a capacidade de infecção enfraquecimento do hospedeiro (Farid et al., 2016; de HC Maciel et al., 2021).

Esse estudo objetivou testar as taxas de mortalidade durante dezesseis dias em larvas de *Ephestia kuehniella* aplicando tratamentos com base do isolado fúngico de *Fusarium sp.*, visando analisar seu potencial como bioinseticida para essa espécie de inseto praga.

MATERIAL E MÉTODOS

Larvas de *Ephestia kuehniella*

Os insetos foram adquiridos no Laboratório de Entomologia da Universidade de Santa Cruz do Sul (Unisc). Foram mantidos em temperatura de 28 ± 2 °C, $50 \pm 20\%$

de umidade e fotoperíodo de 12 em 12 horas. A dieta para as larvas consistiu de farinha de trigo (97%) e levedura de cerveja (3%) (Pezzini et al., 2017).

Fungos entomopatogênicos

O isolado fúngico de *Fusarium* sp. foi isolado e repicado a partir de lagartas de *Agraulis vanillae* na localização de Vera Cruz - RS, para a confirmação da espécie como patogênica, o inóculo foi reintroduzido em larva axênicas, confirmado-o sua infecção em insetos (Ramakuwela et al., 2020). O gênero de *Fusarium* foi confirmado por taxonomia segundo Nelson et al. (1990). O isolado foi repicado a cada 15 dias em meio sabouraud, sendo mantido à 26 °C (\pm 2°C) em temperatura ambiente e sem incidência de luz no Laboratório de Taxonomia de Fungos, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), campus São Gabriel - RS .

Para comparação utilizou-se como controle positivo o inseticida comercial Ballvéria ®, sendo sua formulação à base de *Beauveria bassiana* IBCB 66 em formulação WP. *B. bassiana*, devido a sua ação patogênica já confirmada sobre *Ephestia kuehniella* (Yaman et al. 2021, Sohrabi et al. 2021).

Bioensaio

Para a concentração do isolado fúngico foi realizada a suspensão dos esporos e quantificada sua fração por hemocitômetro (Hughes & Boomsma, 2004). Como controle positivo, o inóculo de Ballvéria ® foi preparado seguindo as recomendações do fabricante, em proporção de 0,075 (kg.p.c/ha). A preparação de inóculo de *Fusarium* sp. seguiu a mesma concentração, sendo preparada a partir de raspados de conídios em cultivos feitos em placas de Petri e água destilada. Para o controle negativo, foi utilizado água destilada (Osório-Frajado & Canal, 2011). O inóculo de *Fusarium* sp. 100% foi diluído nas concentrações de 10% (Tratamento 1), 25%

(Tratamento 2), 50% (Tratamento 3) e a concentração de 100% (Tratamento 4) provinda do inóculo original.

Para os testes foram distribuídas seis larvas para cada placa de Petri, sendo disponibilizadas doze placas para cada tratamento testado. A dieta foi disposta em circunferência junto a cada placa, e a mesma foi isolada para evitar contaminação externa. Com finalidade de garantir o contato das larvas com o inóculo, as mesmas foram submergidas em cada tratamento durante dez segundos (Hughes & Boomsma, 2004 adaptado). Posteriormente, transferidas para as placas de Petri forradas com papel toalha esterilizado em autoclave por 40 min a 100°C. A amostragem foi observada diariamente por um período de 16 dias.

Análise estatística

Os dados relacionados à mortalidade das larvas foram submetidos à análise de variância ANOVA e, quando significativos, pelo teste F. As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 1% de probabilidade. A análise quantitativa dos dados multivariados foi realizada pelo teste Kiviat (Wang et al., 2015). Os dados foram computados e analisados no software estatístico BIOESTAT versão 2 (BIOESTAT, 2000).

RESULTADOS

No início das observações (Figura 1A) as larvas se mostraram ativas e saudáveis. Larvas que receberam a aplicação dos tratamentos, após o terceiro dia mostravam sinais de necrose (Figura 1B e 1C) larvas acometidas pelos fungos apresentavam falta de vigor ou estado letárgico.

Os resultados para cada tratamento demonstraram taxas de mortalidade diversificadas. Os tratamentos T4 e T3 apresentaram maior eficácia, com valores médios variando entre 2.5 e 2.6, respectivamente (Figura 2A). Dentre os resultados,

o T4 apresentou maior valor do que o tratamento convencional comercial (Controle Positivo). Em relação ao espectro de ação, o tratamento T4 apresentou maiores taxas de mortalidade nos primeiros dias de aplicação, enquanto o tratamento T3 apresentou valores menores, porém com maior estabilidade até o meio período do tratamento. Para os tratamentos T1 e T2, os maiores valores foram dispostos entre o 2° e 5° dia de ação, com baixas taxas de mortalidade ao longo de todo o tratamento (Figura 2B).

Tanto para o tratamento convencional (Controle Positivo), quanto para os tratamentos T3 e T4, as maiores taxas de mortalidade ocorrem durante os primeiros dias de implementação dos tratamentos. Demonstrando uma baixa taxa de mortes, mas uma estabilidade de metade do período analisado ao seu final. Para o controle negativo, um aumento na taxa de mortalidade ocorreu após a segunda metade do

tratamento, sendo um fato isolado que pode estar relacionado a fatores extrínsecos.

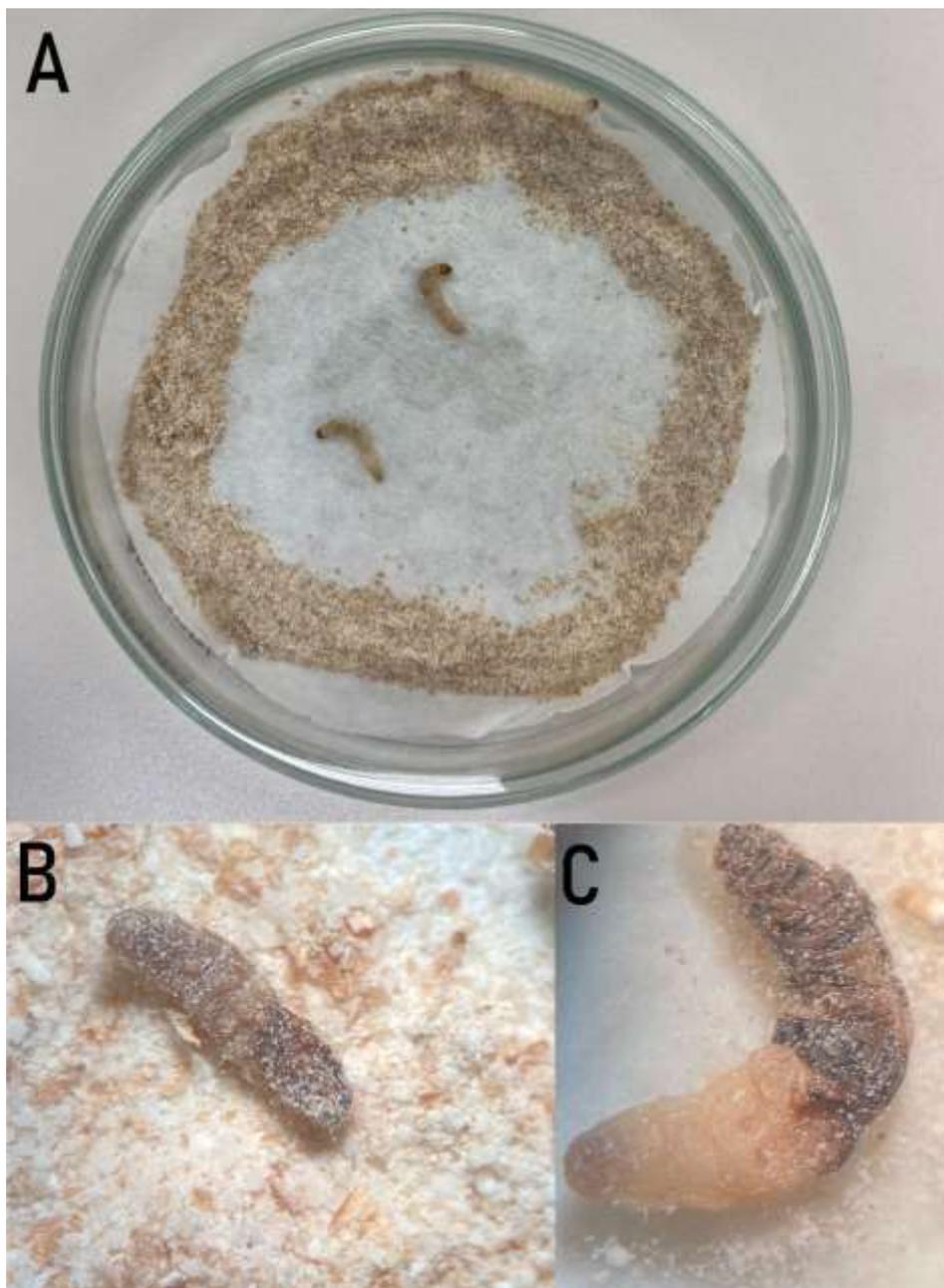


Figura 1. A. larvas de *Ephestia* disposta sobre placa de Petri. B. Larva em tratamento de *Fusarium*. C. Larva em tratamento de *Beauveria bassiana*.

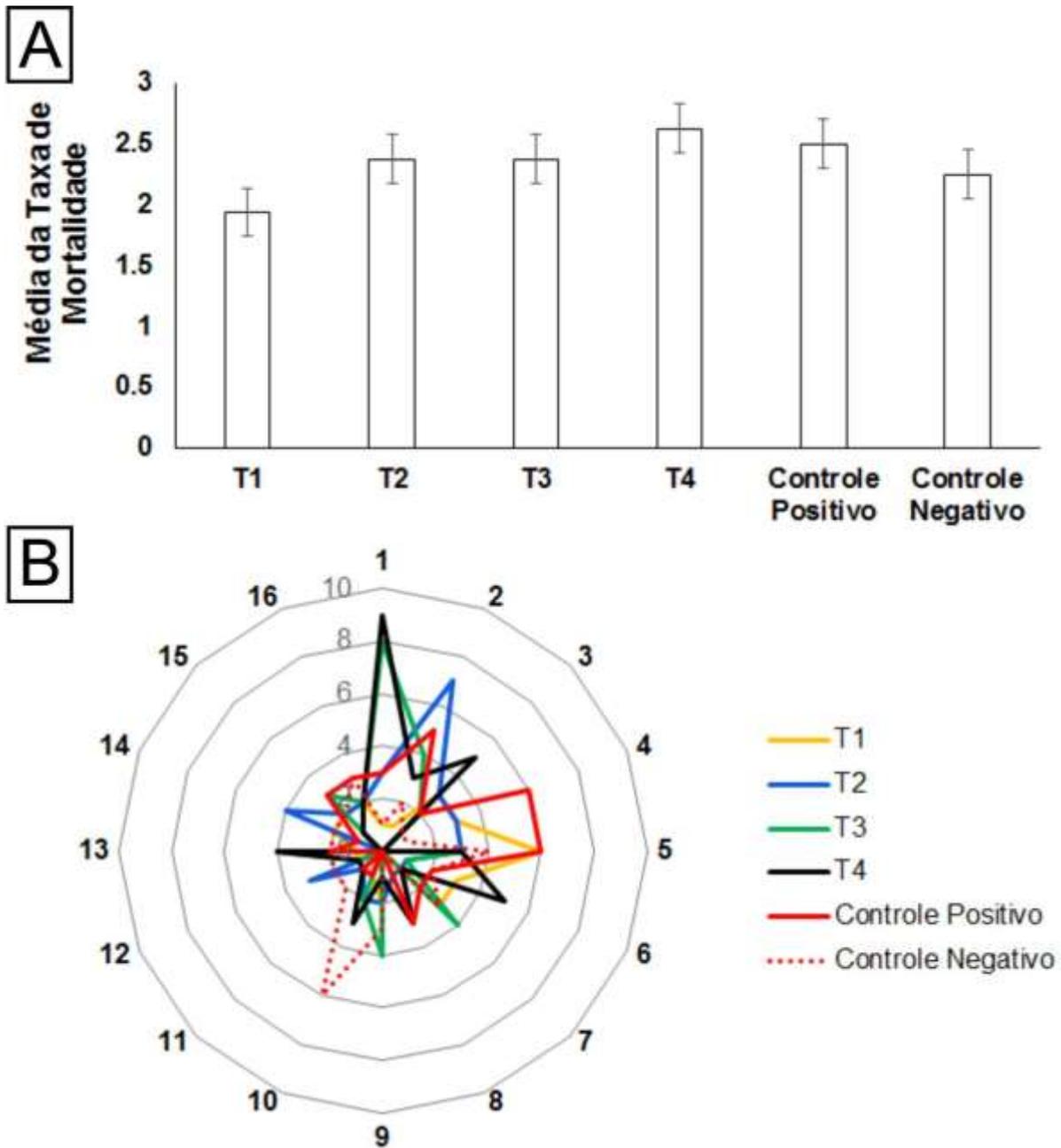


Figura 2. A. Média da taxa de mortalidade entre os tratamentos testados e seus respectivos controles. Média com desvio padrão entre os tratamentos e os controles positivo e negativo. B. Diagrama com os valores das médias da taxa de mortalidade das larvas durante o período das análises. Valores externos em dias (1-16), os valores nos eixos representam o número de mortes por período. Fonte: Autor (2024).

DISCUSSÃO

A interação entre o patógeno e seu hospedeiro é influenciada por diversos fatores, tais como temperatura e umidade, assim como a resposta imunológica do inseto à ação patogênica (Mostafa et al., 2005). A infecção de fungos em *E. kuehniella*, é dependente estágio larval, diversidade genética dos isolados, diferenças em metodologias utilizadas e suscetibilidade de cada população (Sohrabi et al., 2021).

Algumas espécies fúngicas capazes de infectar *E. kuehniella* são conhecidas, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea* são amplamente utilizadas na produção de bioinseticidas (Yaman et al., 2021). De acordo com os resultados providos do controle positivo à base de *B. bassiana*, *Fusarium sp.* pode ser considerada uma espécie potencial para a implementação de novos tratamentos. No geral, em relação as demais espécies fúngicas do mercado, *B. bassiana* demonstra ter melhor desempenho contra insetos pragas do que os demais fungos, alcançando uma taxa de mortalidade igual ou superior a 70% no tempo médio de cinco dias (Yaman et al., 2021, Sohrabi et al., 2021).

B. bassiana produz uma micotoxina chamada beauvericina (Jestoi, 2008). Esse metabólito não é considerado relevante em relação aos seus efeitos na saúde humana e animal, mas atua como um propagador patogênico (Jestoi, 2008, Li et al., 2013). O gênero *Fusarium* é capaz de produzir varios tipos de micotoxinas, tais como fusaproliferina, moniliformina, enniatinas e beauvericina (Jestoi, 2008, Li et al., 2013), sendo necessário mais estudos que auxiliem na compreensão de cada uma delas e suas formas e potencial de ação.

Pouco se explora sobre mecanismos de estresse em artrópodes, e sua ação causada por fungos. No geral, sabe-se que determinadas moléculas são produzidas durante a exposição ao estresse e desencadeiam respostas imunes nos insetos

(Jiang et al., 2019). Além disso, o estresse pode ocasionar a liberação de octopamina na hemolinfa dos insetos, composto capaz de agir no sistema nervoso sendo já relacionado a expectativa de vidas dos mesmos (Davenport & Evans, 1983; Li et al., 2016; Cinel et al., 2020).

No tegumento e intestino dos insetos, ocorre de forma natural a proteção que previne a infecção de patógenos, no entanto, fungos como *B. bassiana* e *Fusarium* possuem o apressório, que tem a capacidade de penetrar a cutícula, permitindo o seu desenvolvimento em todas as partes do corpo do hospedeiro (Mostafa et al., 2005; Sohrabi et al., 2021). Como forma de ação bioinseticida, após a instalação da infecção fúngica ocorre a destruição dos hemócitos do hospedeiro (Kurtulus, 2020; Qin et al., 2023). As micotoxinas produzidas pelos fungos patogênicos são altamente diversificadas com efeitos fitotóxicos, antimicrobianos e inseticidas (Jestoi, 2008, Yaman et al., 2021). E seu potencial de ação nos insetos depende do meio ao qual o fungo está inserido, podendo ocorrer maior ou menor produção de proteases e conídios (Qin et al., 2023).

Fungos de *Fusarium* até o momento haviam sido testadas em *E. kuehniella*, mas sabe-se que os efeitos fungicidas podem variar com a fisiologia do hospedeiro, como comparação *Metarhizium anisopliae*, fungo já descrito como entomopatógeno, acarretou mortalidade em gafanhotos em período de dez dias (*Locusta migratoria*), efetivando *Fusarium* sp. como um biocontrolador similar à essa espécie (Jiang et al., 2019). Não obstante, *B. bassiana* esteve presente em muitos outros estudos, conídios secos da espécie foram testados contra *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae) causando sua mortalidade em até seis dias e em outros testes em larvas de *Maruca vitrata* (Lepidoptera : Crambidae) conquistou uma mortalidade superior à 80% em larvas juvenis e 65% em larvas mais velhas, obtendo resultados melhores do

que no estudo presente (Dannon et al., 2020). A vida útil de fungos entomopatogênicos é considerado curto, entre 2 a 3 semanas, muitas cepas de *B. bassiana* são altamente específicas e em certas condições a infecção pode ser mais prolongada, atrasando a mortalidade do hospedeiro (Dannon et al., 2020; Islam et al., 2021).

A especificidade entre o patógeno e o inseto pode ser bastante alta, e espécies de *Fusarium* só podem ser utilizadas como biocontroladores se forem selecionadas apenas cepas que não acarretem em problemas para espécies não alvo (Farid et al., 2016, de HC Maciel et al., 2021). Tendo isso em vista mais testes devem ser realizados para identificar a virulência de *Fusarium* e insetos hospedeiros.

CONCLUSÃO

Tanto controle feito com base em tratamento comercial quanto tratamento de cepa isolada do gênero *Fusarium* sp.(T4) se mostraram eficientes causando mortalidade em larvas de *E. kuhniella*, o valor de teste F com 1% de significância foi 149.80 e do F-crítico 1.80, rejeitando-se hipótese nula, demonstrando que o tratamento T4 é eficiente no controle de larvas.

REFERÊNCIAS

- Abd El-Aziz, S. E. (2011). Control strategies of stored product pests. *Journal of Entomology*, 8(2), 101–122.
- Ayres, M., & Junior Ayres, M. (2000). BioEstat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. In *BioEstat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas* (pp. xii-259).
- Ayvaz, A., & Karabörklü, S. (2008). Effect of cold storage and different diets on *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep:Pyralidae). *Journal of Pest Science*, 81(1), 57–62.
- Dannon, H. F., Dannon, A. E., Douro-Kpindou, O. K., Zinsou, A. V., Houndete, A. T., Toffa-Mehinto, J., Elegbede, I. A. T. M., Olou, B. D., & Tamò, M. (2020). Toward the efficient use of *Beauveria bassiana* in integrated cotton insect pest management. In *Journal of Cotton Research* (Vol. 3, Issue 1).
- Davenport, A. P., & Evans, P. D. (1984). STRESS-INDUCED CHANGES IN THE OCTOPAMINE LEVELS OF INSECT HAEMOLYMPH. In *Insect Biochem* (Vol. 14, Issue 2).
- de HC Maciel, M., do Amaral, A. C. T., da Silva, T. D., Bezerra, J. D., de Souza-Motta, C. M., da Costa, A. F., ... & de Oliveira, N. T. (2021). Evaluation of Mycotoxin Production and Phytopathogenicity of the Entomopathogenic Fungi *Fusarium caatingaense* and *F. pernambucanum* from Brazil. *Current Microbiology*, 78(4), 1218-1226.
- Cinel, S. D., Hahn, D. A., & Kawahara, A. Y. (2020). Predator-induced stress responses in insects: A review. In *Journal of Insect Physiology* (Vol. 122).
- Farid Mohamed, H., Mohamed, H. F., M El-Naggar, S. E., Swelim, M. A., & Elkhawaga, O. E. (2016). Isolation and Selection of Entomopathogenic Fungi as

Biocontrol Agent against the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). In *Egyptian Journal of Biological Pest Control* (Vol. 26, Issue 2).

Gerken, A. R., & Campbell, J. F. (2022). Spatial and Temporal Variation in Stored-Product Insect Pest Distributions and Implications for Pest Management in Processing and Storage Facilities. In *Annals of the Entomological Society of America* (Vol. 115, Issue 3, pp. 239–252).

Güncan, A., Karayar, Ş., Altunç, Y.E., 2023. Comparative life history and demographic parameters of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) on maize and oat flours. *International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences*, 7(2): 417-427.

Hughes, W. O. H., & Boomsma, J. J. (2004). Let your enemy do the work: Within-host interactions between two fungal parasites of leaf-cutting ants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271(SUPPL. 3).

Hui, Y.H., Bruinsma, L. B., Gorham, J. R., Nip, W. K., Tong, P. S., & Ventresca, P.(2003). *Food Plant Sanitation* (New York, NY: Marcel Dekker, Inc)

Islam, W., Adnan, M., Shabbir, A., Naveed, H., Abubakar, Y. S., Qasim, M., Tayyab, M., Noman, A., Nisar, M. S., Khan, K. A., & Ali, H. (2021). Insect-fungal-interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests. In *Microbial Pathogenesis* (Vol. 159).

Jian, F. (2019). Influences of stored product insect movements on integrated pest management decisions. In *Insects* (Vol. 10, Issue 4).

Jiang, W., Peng, Y., Ye, J., Wen, Y., Liu, G., & Xie, J. (2020). Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* on the mortality and immune response of *Locusta migratoria*. *Insects*, 11(1).

Jestoi, M. (2008). Emerging fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin - A review. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 48, Issue 1, pp. 21–49).

Kılıcı, L., & Altun, N. (2020). The effect of carbohydrates on nutritional preference and development of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Stored Products Research*, 87.

Kurtuluş, A., Pehlivan, S., Achiri, T. D., & Atakan, E. (2020). Influence of different diets on some biological parameters of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Stored Products Research*, 85.

Li, C., Zuo, C., Deng, G., Kuang, R., Yang, Q., Hu, C., Sheng, O., Zhang, S., Ma, L., Wei, Y., Yang, J., Liu, S., Biswas, M. K., Viljoen, A., & Yi, G. (2013). Contamination of Bananas with Beauvericin and Fusaric Acid Produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *PLoS ONE*, 8(7).

Li, Y., Hoffmann, J., Li, Y., Stephano, F., Bruchhaus, I., Fink, C., & Roeder, T. (2016). Octopamine controls starvation resistance, life span and metabolic traits in *Drosophila*. *Scientific Reports*, 6.

Mostafa, A. M., Fields, P. G., & Holliday, N. J. (2005). Effect of temperature and relative humidity on the cellular defense response of *Ephestia kuehniella* larvae fed *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(2), 79–84.

Osorio-Fajardo, A., & Canal, N. A. (n.d.). Selección de Cepas de Hongos Entomopatógenos para el Manejo de *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae) en Colombia Selection of Strains of Entomopathogenic Fungi for Management of *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae) in Colombia.

- Pezzini, C., Jahnke, S. M., & Köhler, A. (2017). Morphological characterization of immature stages of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera, Braconidae) ectoparasitoid of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae). In *Journal of Hymenoptera Research* (Vol. 60, pp. 157–171).
- Rahman, M. U., Chen, P., Zhang, X., & Fan, B. (2023). Predacious Strategies of Nematophagous Fungi as Bio-Control Agents. In *Agronomy* (Vol. 13, Issue 11).
- Sohrabi, F., Jamali, F., & Michaud, J. P. (2021). Sublethal concentrations of spinosad synergize the pathogenicity of fungi to larvae of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *European Journal of Entomology*, 118, 142–147.
- Qin, Y., Liu, X., Peng, G., Xia, Y., & Cao, Y. (2023). Recent Advancements in Pathogenic Mechanisms, Applications and Strategies for Entomopathogenic Fungi in Mosquito Biocontrol. In *Journal of Fungi* (Vol. 9, Issue 7).
- Terziev, V., & Petkova-Georgieva, S. (2019). The Health and Safety Problems According to the Pesticides Usage in the Ecosystem. *SSRN Electronic Journal*.
- Trematerra, P., Athanassiou, C. G., Sciarretta, A., Kavallieratos, N. G., & Buchelos, C. T. (2013). Efficacy of the auto-confusion system for mating disruption of *Ephestia kuehniella* (Zeller) and *Plodia interpunctella* (Hübner). *Journal of Stored Products Research*, 55, 90–98.
- Wang, R. C., Edgar, T. F., Baldea, M., Nixon, M., Wojsznis, W., & Dunia, R. (2015). Process fault detection using time-explicit Kiviat diagrams. *AIChE Journal*, 61(12), 4277-4293.
- Yaman, M., Sağlam, T., & Ertürk, Ö. (2021). Entomopathogens as biological control of the mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 22(2), 338–344.

4. CONCLUSÃO

Esse trabalho amplia os conhecimentos em torno das lagartas pragas de *Passiflora edulis*, demonstrando que pesquisas sobre controladores biológicos para *Dione juno* e *Agraulis vanillae* são incipientes, principalmente os relacionados aos fungos que afligem esses insetos. Os resultados obtidos neste trabalho exibem as principais pesquisas envolvendo *D. juno* e *A. vanillae* ao passar dos anos, apresentando como temas mais frequentes: ecologia, morfologia e ataque ao maracujá. Ademais, os dados encontrados exploram melhor os patógenos fúngicos, discutindo os principais estudos acerca do tema, além de confirmar *Fusarium* sp. como novo patógeno para *A. vanillae*.

Em estudo posterior, *Fusarium* sp. foi submetido a aplicações em *Ephestia kuehniella* Zeller (traça-da-farinha), atestando sua virulência nas larvas do inseto sem necessidade de ingestão do fungo, demonstrando taxas de mortalidade adequadas.

Novos estudos devem ser feitos, em especial para identificação da espécie de *Fusarium* sp., de suas micotoxinas e se o mesmo consegue infectar organismos não-alvo. Entretanto, as primeiras análises demonstraram sua capacidade de causar mazelas às larvas de *E. kuehniella* e *A. vanillae*, sendo possível visar cepas desse organismo mais virulentas aos seus futuros alvos, por meio de condições de cultivo ou até mesmo engenharia genética.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COLLINGE, David B. et al. Biological control of plant diseases—What has been achieved and what is the direction?. *Plant Pathology*, v. 71, n. 5, p. 1024-1047, 2022.

DAR, Showket A.; RATHER, Bashir A.; KANDOO, Ajaz A. Insect pest management by entomopathogenic fungi. *J. Entomol. Zool. Stud.*, v. 5, p. 1185-1190, 2017.

DA SILVA SANTOS, Ana Carla et al. Entomopathogenic *Fusarium* species: a review of their potential for the biological control of insects, implications and prospects. *Fungal Biology Reviews*, v. 34, n. 1, p. 41-57, 2020.

DE HC Maciel, M., do Amaral, A. C. T., da Silva, T. D., Bezerra, J. D. P., de Souza-Motta, C. M., da Costa, A. F., Tiago, P. V., & de Oliveira, N. T. (2021). Evaluation of Mycotoxin Production and Phytopathogenicity of the Entomopathogenic Fungi *Fusarium caatingaense* and *F. pernambucanum* from Brazil. *Current Microbiology*, 78(4), 1218–1226.
<https://doi.org/10.1007/s00284-021-02387-y>

DRIESCHE, R. van; HODDLE, Mark. Non-target effects of insect biocontrol agents and trends in host specificity since 1985. *CABI Reviews*, n. 2016, p. 1-66, 2017.

EL-AASSAR, M. R; SOLIMAN; ABD ELAAL, A.A. Efficiency of sex pheromone traps and some bio and chemical insecticides against tomato borer larvae, *Tuta absoluta* (Meyrick) and estimate the damages of leaves and fruit tomato plant. *Annals of Agricultural Sciences*. v. 60, n. 1, p. 153-156, 2015

GÓNGORA, Carmenza E. et al. Sustainable Strategies for the Control of Pests in Coffee Crops. *Agronomy*, v. 13, n. 12, p. 2940, 2023.

JESTOI, Marika. Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin—A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 48, n. 1, p. 21-49, 2008.

JIANG, Yali; WANG, Jingjing. The registration situation and use of mycopesticides in the world. *Journal of Fungi*, v. 9, n. 9, p. 940, 2023.

KUMAR, Revappa Mohan et al. Sustainable management of invasive fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Agronomy*, v. 12, n. 9, p. 2150, 2022.

LEUNG, Kelley et al. Next-generation biological control: the need for integrating genetics and genomics. *Biological Reviews*, v. 95, n. 6, p. 1838-1854, 2020.

LIU, Tianbo et al. Ecological strategies of biological and chemical control agents on wildfire disease of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *BMC microbiology*, v. 21, n. 1, p. 1-11, 2021.

MANSFIELD, Sarah et al. Climate change impacts on pest ecology and risks to pasture resilience. *NZGA: Research and Practice Series*, v. 17, p. 123-138, 2021.

MANTZOUKAS, Spiridon et al. Potential Use of Fusarium Isolates as Biological Control Agents: *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae) Case Study. *Applied Sciences*, v. 12, n. 17, p. 8918, 2022.

HODDLE, Mark S. A new paradigm: proactive biological control of invasive insect pests. *BioControl*, p. 1-14, 2023.

HOLLAND, John M. et al. Structure, function and management of semi-natural habitats for conservation biological control: a review of European studies. *Pest management science*, v. 72, n. 9, p. 1638-1651, 2016.

HAJEK, Ann E. et al. Two *Fusarium* species pathogenic to gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Mycologia*, v. 85, n. 6, p. 937-940, 1993.

HAJEK, Ann E. et al. Exotic biological control agents: a solution or contribution to arthropod invasions?. *Biological invasions*, v. 18, p. 953-969, 2016

QIN, Yujie et al. Recent Advancements in Pathogenic Mechanisms, Applications and Strategies for Entomopathogenic Fungi in Mosquito Biocontrol. *Journal of Fungi*, v. 9, n. 7, p. 746, 2023.

THUNGRABEAB, M.; TONGMA, S. Effect of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) on non target insects. *Current Applied Science and Technology*, v. 7, n. 1-1, p. 8-12, 2007.

WAAGE, J. K.; GREATHEAD, D. J. Biological control: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, v. 318, n. 1189, p. 111-128, 1988.

WAQUIL, José M. et al. Manejo Integrado de pragas: revisão histórica e perspectivas. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo [resumos expandidos]. Sete Lagoas: ABMS: Embrapa Milho e Sorgo. 2002.