UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS-FCAV

CÂMPUS DE JABOTICABAL

Interações soja–*Beauveria amorpha*–*Euschistus heros*: uma abordagem multitrofica para o manejo de insetos sugadores e proteção de plantas

Lana Letícia Barbosa de Carvalho

Msc. Agronoma

2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS-FCAV

CÂMPUS DE JABOTICABAL

Interações soja–*Beauveria amorpha*–*Euschistus heros*: uma abordagem multitrofica para o manejo de insetos sugadores e proteção de plantas

Doutoranda: Lana Letícia Barbosa de Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk

Coorientador: Everlon Cid Rigobello

Tese apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) Universidade Estadual Paulista (UNESP) Campos de Jaboticabal, como parte de requisito para a obtenção do título de Doutora em Agronomia (Entomologia Agrícola)

2026

C331i

Carvalho, Lana Letícia Barbosa de

Interações soja–Beauveria amorpha–Euschistus heros: uma abordagem multitrof ica para o manejo de insetos sugadores e proteção de plantas / Lana Letícia Barbosa de Carvalho. -- Jaboticabal, 2026

121 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Ricardo Antonio Polanczyk

Coorientador: Everton Cid Rigobello

1. Soja. 2. Fungos endofíticos. 3. Controle Biológico. 4. Relação inseto-planta. 5. Pragas agrícolas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: INTERAÇÕES SOJA-*Beauveria amorpha*-*Euschistus heros*: UMA ABORDAGEM MULTITROFICA PARA O MANEJO DE INSETOS SUGADORES E PROTEÇÃO DE PLANTAS

AUTORA: LANA LETÍCIA BARBOSA DE CARVALHO
ORIENTADOR: RICARDO ANTONIO POLANCZYK
COORIENTADOR: COORIENTADOR: EVERLON CID RIGOBELO
ORIENTADOR DE MOBILIDADE: MICHAEL BIDOCHKA (Internacional)

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Agronomia (Entomologia Agrícola) pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br RICARDO ANTONIO POLANCZYK
Data: 28/04/2026 11:44:15-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK (Participaçao Virtual)
Departamento de Fitóssanidade / UNESP / Câmpus de Jaboticabal - FCAV

Documento assinado digitalmente
gov.br TELMA FATIMA VIEIRA BATISTA
Data: 15/04/2026 15:14:04-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. TELMA FÁTIMA VIEIRA BATISTA (Participaçao Virtual)
Departamento de Ciências Agrárias / Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) - Belém/PA

Documento assinado digitalmente
gov.br ROGERIO BIAGGIONI LOPES
Data: 16/04/2026 07:38:15-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. ROGERIO BIAGGIONI LOPES (Participaçao Virtual)
Recursos Genéticos e Biotecnologia / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Brasília/DF

Documento assinado digitalmente
gov.br SIMONE GRAZIELE MOIO VELOZO
Data: 17/04/2026 18:24:26-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Pesquisadora Dra. SIMONE GRAZIELE MOIO VELOZO (Participaçao Virtual)
UPL do Brasil Industria e Comercio de Insumos Agropecuarios S/A / Pereiras/SP

Documento assinado digitalmente
gov.br DANIEL JUNIOR DE ANDRADE
Data: 17/04/2026 11:19:49-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. DANIEL JUNIOR DE ANDRADE (Participaçao Virtual)
Departamento de Fitossanidade / UNESP / Câmpus de Jaboticabal - FCAV

Jaboticabal, 10 de abril de 2026.

RESUMO DO CURRICULO DA AUTORA DA TESE

Lana Letícia Barbosa de Carvalho nasceu em 22 de fevereiro de 1995, em Abaetetuba, Pará, Brasil. Estudante de escola publica durante toda sua vida, tornou-se Engenheira Agronômica em 2017 Pela Universidade Federal Rural da Amazonia (UFRA) Campos de Parauapebas, Pará, Brasil. Durante a graduação, participou de projetos e iniciações cientificas desde o primeiro período, até que ao 5 período, começou o seu estágio com a entomologia onde se firmou e iniciou sua jornada na área. Na graduação, desenvolveu projetos de pesquisas com levantamento entomofaunistico de insetos de importância econômica para culturas agrícolas amazônicas, foi monitora da disciplina de entomologia agrícola e florestal, participou de congressos específicos e estagiou na no Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais, na Universidade Estadual Paulista (UNESP) Botucatu, São Paulo, Brazil, sob supervisão do professor Dr. Carlos Frederico Wilken. Iniciou o mestrado em 2019 na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Campos sede, Belém, Pará, Brasil, sob a orientação da professora Telma Fátima Vieira Batista. Onde trabalhou com levantamento faunístico de insetos de importância para a cocoicultura. Associado a dissertação, também participou de um projeto de prospecção de fungos e bactérias entomopatogênicos e endofíticos em solos agrícolas e florestais amazônicos. Em 2021 iniciou o trabalho como pesquisadora assistente na Empresa Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial (Embrapii), no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano - Unidade de Biocontroladores de Pragas Agrícolas da Esalq/USP, em Piracicaba-SP, sob a supervisão do Professo Dr Italo Delalibera Jr, onde desenvolveu pesquisas em formulação de biopesticidas, produção de fungos entomopatogênicos e endofíticos, e associação desses fungos com fertilizantes, criação de insetos e ácaros, e realização de bioensaios. Em 2022, iniciou o Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brasil, com foco nas interações entre microrganismos entomopatogênicos endofíticos e insetos-praga em culturas agrícolas, sob orientação do professor Ricardo Antonio Polanczyk. Em 2024, realizou o intercambio de doutorado na Brock University, Canadá, sob a orientação do professor Michael J. Bidochka.

Aos meus pais, Maria Quitéria e Levi Carvalho,

que, mesmo sob o sol mais forte, fizeram sombra para que eu pudesse voar e alcançar aquilo que, nem nos nossos melhores sonhos, parecia realidade. Esta não é apenas uma tese que escrevi; é o reflexo do amor e da confiança que vocês sempre me deram.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Santíssima Trindade, Deus Pai, Filho e Espírito Santo, por ter me concedido o dom da sabedoria, por me guardar e proteger ao longo de todo o meu doutorado. Agradeço também à Nossa Senhora de Nazaré, por interceder continuamente por mim junto ao Pai.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pelo financiamento da bolsa de estudos durante todo o período do doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola e a todos os professores do programa, pelos conhecimentos transmitidos ao longo da minha formação. Da mesma forma, agradeço a todos os técnicos e prestadores de serviços da UNESP/FCAV, por proporcionarem um ambiente adequado para o desenvolvimento das atividades do meu doutorado.

Ao Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP), pela concessão da bolsa que possibilitou a realização do meu intercâmbio no Canadá por seis meses. À Brock University e ao Professor Dr. Michael J. Bidochka, pelo aceite, acolhimento e disponibilidade para o desenvolvimento das minhas atividades durante esse período.

Ao meu orientador, Professor Dr. Ricardo Antonio Polanczyk, pela orientação, apoio e incentivo que foram essenciais para o meu desenvolvimento profissional.

Ao meu coorientador, Professor Dr. Everlon Rigobelo, por ter aberto as portas do seu laboratório e disponibilizado recursos para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas (LCMAP), pela estrutura e suporte necessários para a realização deste doutorado. Assim como, todas as pessoas do LCMAP que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dos experimentos e para a elaboração desta tese. Em especial, agradeço a Gustavo Carneiro, que além de estagiário, tornou-se um grande amigo, oferecendo não apenas apoio técnico, mas também amizade e suporte nos momentos em que mais precisei.

Aos pós-doutorandos Carlos Henrique e Allan Bacha, e a técnica Andressa Pollo, pela disponibilidade, atenção e por sempre compartilharem seus conhecimentos, contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento desta tese.

À toda minha família, em especial aos meus pais, Levi Carvalho e Maria Quitéria, e ao meu querido e amado irmão, Luan Levi, por serem minha base, minha força e minha maior motivação. Sem o amor e o apoio de vocês, eu jamais teria conseguido concluir este doutorado.

Aos meus avós Joana Campos, Antônio Barbosa, Nestor Carvalho (em memória) e Ivete Carvalho (em memória), que sempre oraram e celebraram comigo cada conquista da minha vida. Em especial à minha avó Ivete, que chorou de alegria ao saber da minha aprovação no doutorado, mas que hoje não está presente para ver a conclusão desta etapa tão importante.

Ao meu marido e companheiro de vida, Danyllo Oliveira, por todo o apoio emocional e profissional ao longo deste doutorado. Você foi meu suporte nos momentos mais difíceis e a força que me sustentou quando pensei em desistir. Você é o amor da minha vida. Agradeço também a família do meu esposo, Rejane Oliveiral, Irenaldo Oliveira, Daniel Oliveira e Jamylli Gomes pelo apoio e incentivo.

Aos meus amigos de vida, que sempre me apoiaram ao longo dessa trajetória e estiveram presentes na minha vida: Carolane Silva, Carolina Jucá, Bruno Anhê, Jonathan e Aline Nunes. Em especial, Gislayne Valente, que me apoiou na fé e no amor de uma amizade sustentado por Deus.

Aos amigos que fiz durante o doutorado e que se tornaram minha família em Jaboticabal: Sabrina Oliveira, Vinícius Ferraz, Letícia Barbosa, Pedro Peixoto, Joice Mendonça, Linda Caroline, Paulo Silva, Alessandra Andrade e Jeane Leite.

E a todos que de forma direta ou indireta me ajudaram durante o meu doutorado, meu muito obrigada

SUMÁRIO

	Página
RESUMO …….....	iii
ABSTRACT …….....	iv
CAPÍTULO 1- Considerações gerais…….....	01
Referencias …….....	06
CAPÍTULO 2- *Beauveria amorpha* **inoculada em planta de soja controla de forma sistêmica o percevejo marrom da soja** *Euschistus heros* …….....	14
Resumo ……..…….....	14
1. Introdução ……..…….....	15
2. Material e métodos ...…….....	17
2.1. Criação de insetos .....…….	17
2.2. Escolha e identificação do isolado fúngico de *Beauveria amorpha* …….....	18
2.3. Implementação do experimento casa de vegetação	19
2.4. Bioensaio com *Euschitus heros* em plantas de soja	21
2.5. Confirmação de inoculação de *Beauveria amorpha* em tecidos vegetais de soja	21
2.6. Identificação molecular da presença e ausência de *Beauveria amorpha* nas plantas e insetos	22
2.7. Análise de dados .....…….....	24
3. Resultados ……..…….....	25
3.1. Identificação do isolado fúngico de *Beauveria amorpha* ...	25
3.2. Mortalidade e sobrevivência de *Euschitus heros*	26
3.3. Confirmação endofítica de *Beauveria amorpha* em tecidos vegetais da soja.....	26
3.4. Identificação da presença de *Beauveria amorpha* nas plantas inoculadas e insetos	26
4. Discussão …….....	34
5. Conclusão …….....	40
Referencias ……..…….....	41
CAPÍTULO 3- Efeitos multidimensionais de *Beauveria amorpha* **endofítica em soja: Parâmetros fisiológicos, fitormônios, promoção de crescimento e tolerância à herbivoria de** *Euschitus heros* …….....	50
Resumo …….....	50
1. Introdução …….....	51
2. Material e métodos ...……..	53
2.1. Criação dos insetos …….....	53
2.2. Isolado fúngico utilizado ...…….....	54
2.3. Atividades de promoção do crescimento de do isolado fúngico de *Beauveria amorpha*	54
2.3.1 Avaliação qualitativa da solubilização de fosfato	55
2.3.2 Quantificação da solubilização de fosfato por *Beauveria amorpha*	55
2.3.3 Produção e quantificação de ácido indolacético (AIA)	56
2.3.4 Produção de sideráforos	57

2.3.5 Avaliação da atividade da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACC deaminase)	57
2.4. Implementação do experimento em casa de vegetação	59
2.5. Análises de confirmação de inoculação de *Beauveria amorpha* em tecidos das plantas de sojas	60
2.6. Análises fisiológicas das plantas de soja	60
2.7. Análise dos atributos de crescimento das plantas de soja.. …….....	61
2.8. Análises hormonais das plantas de soja	62
2.9. Análise de dados …….....	64
3. Resultados …….....	64
3.1. Indicadores de promoção de crescimento de *Beauveria amorpha* …….....	64
3.2. Confirmação de inoculação de *Beauveria amorpha* em plantas de soja …….....	66
3.3. Análise dos atributos de crescimento das plantas de soja …….....	68
3.4. Análises fisiológicas em plantas de soja …….....	70
3.5. Análises hormonais …….....	74
4. Discussão …….....	79
5. Conclusão …….....	86
Referencias ..……	86
CAPÍTULO 4- The inoculation of *Beauveria amorpha* in soybean plants influences the attractive behavior of *Euschistus heros* ……	98
Abstract ……	98
1. Introduction …….....	99
2. Results.....…….....	100
2.1. Identification of the *Beauveria amorpha* fungal isolate……	100
2.2. Olfactory responses of *Euschistus heros* to plants inoculated with *Beauveria amorpha*……..	100
2.3. Evaluation of *Beauveria amorpha* Inoculation in Soybean Plants …….	101
3. Discussion…….....	102
4. Methods ……	104
4.1. Establishment and rearing of *Euschistus heros* in the laboratory ……	104
4.2. Selection and identification of the fungal isolate of *Beauveria amorpha*…….	105
4.3. Implementation of the experiment at greenhouse……..	106
4.4. Olfactory responses of *Euschistus heros* to plants inoculated with *Beauveria amorpha*……..	107
4.5. Fungal inoculation assessment…….....	108
4.7. Statistical analysis…….....	108
References ……...	109
CAPÍTULO 5- Considerações finais e perspectivas futuras ……..	118

Interações soja–*Beauveria amorpha*–*Euschistus heros*: uma abordagem multitrofica para o manejo de insetos sugadores e proteção de plantas

RESUMO - A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das principais culturas agrícolas do mundo, com sua produção frequentemente comprometida por insetos sugadores, entre eles, o percevejo-marrom *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae), principal praga da cultura na região Neotropical. O manejo desse inseto baseia-se no uso de inseticidas químicos, estratégia que apresenta limitações associadas à baixa eficiência frente ao hábito alimentar sugador, à necessidade de reaplicações frequentes e aos impactos socioambientais. Nesse contexto, fungos entomopatogênicos do gênero *Beauveria* emergem como alternativas relevantes no manejo de pragas; contudo, sua aplicação tradicional por contato cuticular apresenta restrições relacionadas à biologia do inseto e à baixa persistência no campo. O uso desses fungos como endofíticos pode representar uma alternativa para aumentar a eficiência do controle biológico de insetos sugadores, especialmente quando se investigam espécies ainda pouco exploradas, como *Beauveria amorpha*. A presente tese investigou, sob uma abordagem multitrofica integrada, as interações entre plantas de soja, o fungo entomopatogênico *B. amorpha* e *E. heros*, com ênfase no papel do endofitismo funcional como estratégia de manejo sistêmico. No primeiro capítulo, investigou-se a possibilidade de controle de *E. heros* por meio da ingestão de tecidos vegetais colonizados endofiticamente, com confirmação molecular e dos tecidos vegetais da presença do fungo em plantas e insetos. No segundo capítulo, analisaram-se os efeitos da colonização endofítica de *B. amorpha* sobre a fisiologia vegetal, incluindo trocas gasosas, crescimento e balanço hormonal, revelando uma reprogramação fisiológica sistêmica associada à maior tolerância da planta à herbivoria por *E. heros*, sem intensificação de defesas clássicas. No terceiro capítulo, avaliou-se a interferência da colonização endofítica por *B. amorpha* no comportamento de *E. heros*, demonstrando que a associação fungo–planta altera a atratividade da soja, sugerindo modulação da emissão de compostos orgânicos voláteis. Em conjunto, os resultados demonstram que *B. amorpha* atua como um componente multifuncional do agroecossistema da soja, influenciando o comportamento e a sobrevivência de *E. heros* e modulando respostas fisiológicas da planta hospedeira. Esta tese amplia a compreensão do papel do fungo entomopatogênicos *B. amorpha* para além da patogenicidade direta, destacando o endofitismo como uma via promissora para o desenvolvimento de estratégias inovadoras, sistêmicas e sustentáveis tanto para melhoria da qualidade da planta, quanto para o manejo do inseto sugador da soja *E. heros*.

Palavras-chave: Soja; Fungo endofítico; Controle biológico; Relação inseto-planta; Pragas agrícolas

Soybean–*Beauveria amorpha*–*Euschistus heros* Interactions: A Multitrophic Approach to the Management of Sap-Sucking Insects and Plant Protection

ABSTRACT- Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is one of the most important agricultural crops in the world, and its production is frequently compromised by sap-sucking insects, including the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae), the primary pest of soybean in the Neotropical region. The management of this insect relies predominantly on chemical insecticides, a strategy limited by reduced efficacy against piercing–sucking feeding behavior, the need for repeated applications, and associated socio-environmental impacts. In this context, entomopathogenic fungi of the genus *Beauveria* have emerged as promising alternatives for pest management; however, their conventional application via cuticular contact presents constraints related to insect biology and limited field persistence. The use of these fungi as endophytes may represent a viable alternative to enhance biological control efficiency against sap-sucking insects, particularly when exploring under-investigated species such as *Beauveria amorpha*. This study investigated, under an integrated multitrophic framework, the interactions among soybean plants, the entomopathogenic fungus *B. amorpha*, and *E. heros*, with emphasis on the role of functional endophytism as a systemic management strategy. The first chapter investigated the potential for controlling *E. heros* through the ingestion of endophytically colonized plant tissues, with molecular confirmation of fungal presence in both plant tissues and insects. In the second chapter, the physiological effects of endophytic colonization by *B. amorpha* were assessed, including gas exchange parameters, plant growth, and hormonal balance. Results revealed a systemic physiological reprogramming associated with increased plant tolerance to herbivory by *E. heros*, without the intensification of classical defense mechanisms. In the third chapter, the effects of endophytic colonization by *B. amorpha* on the behavior of *E. heros* were evaluated, demonstrating that the fungus–plant association alters soybean attractiveness, suggesting modulation of volatile organic compound emissions. Collectively, the findings demonstrate that *B. amorpha* acts as a multifunctional component of the soybean agroecosystem, influencing the behavior and survival of *E. heros* while modulating host plant physiological responses. This thesis expands the understanding of the role of the entomopathogenic fungus *B. amorpha* beyond direct pathogenicity, highlighting endophytism as a promising pathway for the development of innovative, systemic, and sustainable strategies both for improving plant quality and for managing the soybean sucking insect *E. heros*.

Keywords: Soybean; Endophytic fungus; Biological control; Insect–plant relationship; Agricultural pests

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das principais culturas agrícolas global, com papel definido na segurança alimentar mundial, na produção de proteína vegetal e animal e no fornecimento de matérias-primas para os setores alimentício, energético e industrial (Food and Agriculture Organization (FAO), 2025; Messina, 2022; United States Department of Agriculture – Foreign Agricultural Service, 2026; Vargas-Almendra et al., 2024). Em escala mundial, há uma estimativa que a área mundial colhida de soja seja por volta de 136,9 milhões de hectares (Peng et al., 2025), com Estados Unidos, Brasil e Argentina respondendo por 80% da produção global (Food and Agriculture Organization, 2025). O Brasil é o maior produtor e exportador da cultura, sendo a soja um dos principias pilares do agronegócio nacional e um componente estratégico da economia agrícola (United States Department of Agriculture – Foreign Agricultural Service, 2026). Além de sua relevância econômica direta, a soja sustenta cadeias produtivas complexas, como a indústria de rações, óleos vegetais e biocombustíveis, movimentando volumes expressivos de insumos agrícolas, incluindo fertilizantes, corretivos, sementes melhoradas e defensivos(Vieira filho, 2024).

Com a intensificação dos sistemas produtivos de cultura da soja e a expansão contínua das áreas cultivadas têm sido verificado um aumento significativo da pressão exercida por insetos-praga, responsáveis por perdas expressivas de produtividade e qualidade dos grãos (Panizzi et al., 2022; Tessmer et al., 2022). Os danos causados por insetos herbívoros resultam em prejuízos econômicos relevantes, especialmente quando associados a insetos sugadores, cujos efeitos fisiológicos sobre a planta são cumulativos, frequentemente não visuais e, em muitos casos, subestimados (C. Li et al., 2024; Timbó et al., 2014). Nesse contexto, o manejo de pragas na cultura da soja representa não apenas um desafio agronômico, mas também um fator determinante para a sustentabilidade econômica e ambiental dos sistemas agrícolas modernos.

Entre os insetos-praga sugadores associados à cultura da soja, o percevejo-marrom-da-soja, *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae), destaca-se como a principal praga na região Neotropical, especialmente no Brasil, onde ocorre de forma generalizada nas áreas produtoras (Bueno et al., 2013; de F. Bueno et al., 2024; Saluso et al., 2011). A relevância desse percevejo no contexto da Entomologia Agrícola decorre tanto de sua ampla distribuição geográfica quanto de sua elevada capacidade de causar danos econômicos expressivos, mesmo sob densidades populacionais relativamente baixas (Tibola et al., 2021). Ao longo das últimas décadas, *E. heros* consolidou-se como espécie-chave nos programas de manejo integrado de pragas da soja e como organismo-modelo para estudos envolvendo insetos sugadores (Silva et al., 2012; E. S. Souza et al., 2017; Timbó et al., 2014).

E. heros é um inseto de hábito sugador, dotado de aparelho bucal do tipo picador-sugador, especializado na ingestão de seiva vegetal (Panizzi, 1997; E. S. Souza et al., 2017; Villas Boas & Panizzi, 1980). Durante a alimentação, o inseto perfura tecidos da planta e injeta saliva contendo enzimas digestivas e compostos bioativos, que promovem degradação celular localizada e interferem diretamente no funcionamento fisiológico da planta (Corrêa-Ferreira & De Azevedo, 2002; Villas Boas & Panizzi, 1980). Esse processo compromete o transporte de fotoassimilados, altera o balanço hormonal e reduz a eficiência fotossintética (Pieterse et al., 2012; Y. Wang et al., 2021). Diferentemente dos danos causados por insetos mastigadores, os efeitos da herbivoria por insetos sugadores como o *E. heros* são cumulativos e frequentemente pouco visíveis em estágios iniciais, o que dificulta a detecção precoce da danos no campo, além de afetarem os ajustes hormonais complexos e causar custos metabólicos elevados para a planta(H. Li et al., 2023; Walling, 2000; Zvereva et al., 2010).

Os danos primários causados por *E. heros* estão associados principalmente à alimentação em órgãos reprodutivos da soja, como vagens e grãos em desenvolvimento, resultando em abortamento de estruturas reprodutivas, redução do número de grãos por vagem, diminuição do peso dos grãos e formação de grãos chochos ou deformados (Bueno et al., 2013; de F. Bueno et al., 2024; Timbó et al., 2014; Villas Boas & Panizzi, 1980). Além desses

danos diretos, a infestação por *E. heros* está relacionada a danos secundários, como a facilitação da entrada de microrganismos patogênicos oportunistas e a ocorrência de grãos esverdeados, fenômeno associado à interferência hormonal durante a maturação(Okosun et al., 2024).Esses efeitos comprometem a qualidade industrial da soja e ampliam o impacto econômico da infestação.

O manejo de *E. heros* baseia-se predominantemente na aplicação de inseticidas químicos, guiada por níveis de ação estabelecidos para a cultura da soja (Bueno et al., 2013; Roggia et al.,2018). No entanto, essa estratégia enfrenta desafios crescentes, como a necessidade de reaplicações frequentes, a seleção de populações resistentes e os impactos negativos sobre inimigos naturais, baixa eficiência de produtos de contato frente ao hábito alimentar sugador do inseto e problemas relacionados a resistências desses insetos a esses produtos químicos (Guedes, 2017; Lucini et al., 2021; E. S. Souza et al., 2017; Tuelher et al., 2018). Esses fatores reforçam a necessidade de estratégias complementares e sustentáveis, capazes de atuar de forma sistêmica e integrada ao metabolismo da planta.

Nesse cenário, os fungos entomopatogênicos surgem como uma das principais alternativas dentro do controle biológico de insetos-praga (Shehzad et al., 2025). Tradicionalmente, esses fungos são aplicados por pulverização direta, com infecção ocorrendo via contato cuticular (Cheong et al., 2020; Clifton et al., 2023; Ortiz-Urquiza et al., 2010; Zimmermann, 2007). Embora esse método de utilização seja eficiente para diversos grupos de insetos, sua eficácia depende fortemente de condições ambientais favoráveis, cujo fatores como temperatura e umidade podem reduzem a viabilidade dos conídios. Essa restrição impulsiona uma ampliação conceitual sobre o papel dos fungos entomopatogênicos nos agroecossistemas, especialmente com o reconhecimento de que algumas espécies podem atuar como endófitos (Altaf et al., 2023; Mwamburi, 2021; Ramos et al., 2020).

O endofitismo por fungos entomopatogênicos permite que esses microrganismos colonizem tecidos vegetais internos sem causar sintomas aparentes, atuando simultaneamente como simbiontes da planta e antagonistas de insetos herbívoros (Aravinthraju et al., 2024; Bhunjun et al., 2024; Liao et al.,

2025; L. Liu et al., 2025; Mwamburi, 2021; Sinno et al., 2021). A colonização endofítica amplia o espectro de ação dos fungos entomopatogênicos, possibilitando efeitos diretos e indiretos sobre insetos-praga, como alterações no comportamento alimentar, redução do desempenho biológico e, potencialmente, infecção via ingestão de tecidos vegetais colonizados (Geedi et al., 2023; George et al., 2024; González-Mas et al., 2021; Lugtenberg et al., 2016; Wei et al., 2020a). Esses mecanismos tornam o endofitismo particularmente relevante para o manejo de insetos sugadores, historicamente considerados pouco suscetíveis às estratégias convencionais de controle biológico.

Dentro desse contexto, o gênero *Beauveria* assume papel central. Apesar de sua ampla distribuição e importância histórica no controle biológico, a maioria dos estudos e aplicações concentra-se em *Beauveria bassiana*, enquanto outras espécies permanecem pouco exploradas (Altaf et al., 2023; Russo et al., 2019; Wei et al., 2020b). Avanços recentes na taxonomia molecular demonstraram que *B. bassiana* corresponde a um complexo de espécies filogeneticamente distintas, entre as quais *Beauveria amorpha* emerge como uma espécie claramente delimitada na sua diferença de identificação, porém ainda negligenciada sob os pontos de vista ecológico e funcional (D. A. de Souza et al., 2020). *B. amorpha* é fungo entomopatogênico promissor que permanece pouco explorado, embora com registros de sua ocorrência associada a solos, plantas e artrópodes-praga, evidenciando seu potencial para manejo de pragas (Campos et al., 2005; D. A. de Souza et al., 2020). A investigação de *B. amorpha* é particularmente relevante, uma vez que diferentes espécies de *Beauveria* podem apresentar capacidades distintas de colonização endofítica, persistência nos tecidos vegetais e impacto sobre plantas e insetos (Hyde et al., 2010; Rehner & Buckley, 2005).

Além de causar efeitos sob insetos, fungos entomopatogênicos endofíticos podem exercer influência significativa sobre a fisiologia vegetal e hormonal da planta (Ahsan et al., 2024; Campos et al., 2005; Lu et al., 2021). Evidências indicam que microrganismos associados às plantas atuam como moduladores metabólicos e reguladores da sinalização hormonal, ajustando a intensidade e a duração das respostas ao estresse biótico (Bastías et al., 2022;

Lu et al., 2021). Em vez de intensificar mecanismos clássicos de defesa, esses fungos podem promover tolerância à herbivoria, caracterizada pela manutenção da eficiência fotossintética, do crescimento e do desempenho fisiológico da planta, mesmo sob ataque de insetos sugadores. Essa modulação do 'trade-off' crescimento–defesa confere aos fungos entomopatogênicos endofíticos um papel multifuncional nos agroecossistemas (Baron & Rigobelo, 2022; Poudel et al., 2021).

A associação endofítica de fungo do gênero *Beauveria* pode alterar a emissão de compostos orgânicos voláteis pelas plantas, interferindo diretamente no comportamento de insetos, como os sugadores (Bruce & Pickett, 2011; X. Wang et al., 2024). Alterações na atratividade ou repelência das plantas hospedeiras afetam etapas críticas da interação planta–inseto, como a localização e seleção do hospedeiro, reduzindo a colonização inicial e o estabelecimento populacional (Bruce & Pickett, 2011; Farrokhzadeh et al., 2025; González-Mas et al., 2019; Gurulingappa et al., 2010a; Ramírez-Ordorica et al., 2024; X. Wang et al., 2024). Em conjunto, esses efeitos comportamentais, fisiológicos e, potencialmente, letais ampliam o entendimento do controle biológico para além da mortalidade direta do inseto.

Dessa forma, este estudo adota em três capítulos, uma abordagem multitrofica integrada para investigar as interações entre plantas de soja, o fungo entomopatogênico *Beauveria amorpha* e o percevejo-marrom *Euschistus heros*.

1. No primeiro capítulo desta tese, investiga-se a possibilidade de controle de *E. heros* pelo contato alimentar em plantas de soja colonizados por *B. amorpha*.
2. No segundo capítulo, analisam-se os efeitos da associação endofítica sobre a fisiologia vegetal, incluindo trocas gasosas, crescimento e sinalização hormonal, buscando compreender os mecanismos de tolerância da planta à herbivoria quando inoculada com *B. amorpha*.
3. No terceiro capítulo, avalia-se como a colonização endofítica por *B. amorpha* interfere no comportamento atrativo/repelente de *E. heros*, com foco na modulação de sinais químicos da planta em diferentes concentrações fúngicas e locais de inoculação na soja.

Esses capítulos contribuem para ampliar o entendimento do papel de fungo entomopatogênico *Beauveria amorpha* como componente ativo e multifuncional do agroecossistema, oferecendo bases conceituais e experimentais para o desenvolvimento de estratégias inovadoras e sustentáveis de manejo de insetos sugadores na cultura da soja. Logo, essa tese teve como objetivo investigar o uso do fungo *B. amorpha* como endofítico na soja e seus efeitos no inseto sugador *E. heros* e na planta.

Referências

Ahsan SM, Injamum-Ul-Hoque M, Das AK, Rahman MM, Mollah MMI, Paul NC, Choi HW (2024) Plant–entomopathogenic fungi interaction: recent progress and future prospects on endophytism-mediated growth promotion and biocontrol. **Plants** 13:1420.

Altaf N, Ullah MI, Afzal M, Arshad M, Ali S, Rizwan M, Al-Shuraym LA, Alhelaify SS, Sayed S (2023) Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in maize plants affects the fitness of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Microorganisms** 11:1067.

Aravinthraju K, Shanthi M, Murugan M, Srinivasan R, Maxwell LA, Boopathi NM, Anandham R (2024) Endophytic entomopathogenic fungi: their role in enhancing plant resistance, managing insect pests, and synergy with management routines. **Journal of Fungi** 10:865.

Baron NC, Rigobelo EC (2022) Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. **Mycology** 13:39-55.

Bastías DA, Gianoli E, Gundel PE (2022) How and when fungal endophytes can eliminate the plant growth–defence trade-off: mechanistic perspectives. **New Phytologist** 235:1419-1433.

Bhunjun CS, Phukhamsakda C, Hyde KD, Jeewon R (2024) Do all fungi have ancestors with endophytic lifestyles? **Fungal Diversity** 125:1-23.

Bruce TJA, Pickett JA (2011) Perception of plant volatile blends by herbivorous insects – finding the right mix. **Phytochemistry** 72:1605-1613.

Bueno AF, Panizzi AR, Hunt TE, Dourado PM, Pitta RM, Gonçalves J (2013) Economic thresholds in soybean-integrated pest management: old concepts, current adoption, and adequacy. **Neotropical Entomology** 42:439-447.

Campos RA, Arruda W, Boldo JT, Silva MV, Barros NM (2005) Boophilus microplus infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. **Current Microbiology** 50:257-261.

Cheong PCH, Glare TR, O'Callaghan M (2020) Lack of involvement of chitinase in direct toxicity of *Beauveria bassiana* cultures to the aphid *Myzus persicae*. **Journal of Invertebrate Pathology** 169:107281.

Clifton EH, Hajek AE, Jenkins NE, Grieshop MJ (2023) Cryptic diversity and virulence of *Beauveria bassiana* recovered from *Lycorma delicatula* (spotted lanternfly) in eastern Pennsylvania**. Frontiers in Insect Science** 3:1158324.

Corrêa-Ferreira BS, Azevedo J (2002) Soybean seed damage by different species of stink bugs. **Agricultural and Forest Entomology** 4:145-150.

De F Bueno A, Bueno RCOF, Sosa-Gómez DR, Corrêa-Ferreira BS (2024) Augmentative biological control of stink bugs on soybean: the Brazilian scenario. **CABI Agriculture and Bioscience** 5:63.

De Souza DA, Rocha LFN, Delalibera I Jr, Luz C (2020) Assessment of the diversity of Brazilian entomopathogenic fungi in the genus *Beauveria*. **Journal of Invertebrate Pathology** 171:107347.

Farrokhzadeh H, Jaronski ST, Rashed A (2025) Reduced survivorship, host preference, and feeding damage by *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton plants colonized by the endophyte *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). **Journal of Economic Entomology** 118:523-530.

Food and Agriculture Organization (FAO) (2024) FAOSTAT – **Crop production (soja).** Disponível em:https://www.fao.org/faostat/. Acesso em: 02 fev. 2026.

Geedi R, Canas L, Reding ME, Ranger CM (2023) Attraction of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) to volatiles emitted from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Environmental Entomology** 52:31-38

George J, Alves TM, Niassy S, Subramanian S, Reddy GVP (2024) Role of endophytic entomopathogenic fungi in mediating host selection, biology, behavior, and management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). **Plants** 13:2123.

González-Mas N, Cuenca-Medina M, Quesada-Moraga E (2019) Effects of endophytic entomopathogenic ascomycetes on the life-history traits of *Aphis gossypii* Glover and its interactions with melon plants. **Insects 10**:165.

González-Mas N, Gutiérrez-Sánchez F, Quesada-Moraga E (2021) Endophytic colonization by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* affects plant volatile emissions in the presence or absence of chewing and sap-sucking insects. **Frontiers in Plant Science** 12:660096.

Guedes RNC (2017) Insecticide resistance, control failure likelihood and the First Law of Geography. **Pest Management Science** 73:479-484.

Gurulingappa P, McGee PA, Sword GA (2010) Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. **Biological Control** 55:34-41.

Hyde KD, Chomnunti P, Crous PW, Groenewald JZ, Damm U, Ko-Ko TW, Shivas RG, Summerell BA, Tan YP (2010) A case for re-inventory of Australia's plant pathogens. **Persoonia** 25:50-60.

Li C, Zhang Y, Wang X, Li Y, Chen H, Li Z (2024) Elucidating the ecophysiology of soybean pod-sucking stinkbug *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae) based on de novo genome assembly and transcriptome analysis**. BMC Genomics** 25:1143.

Li H, Zhang X, Huang H, Li Y, Zhu Y (2023) Infestation by the piercing–sucking herbivore *Nilaparvata lugens* systemically triggers JA- and SA-dependent defense responses in rice. **Biology** 12:864.

Liao C, Chen Y, Li X, Hyde KD, Jeewon R (2025) Challenges and update on fungal endophytes: classification, definition, diversity, ecology, evolution and functions. **Fungal Diversity** 131:301-367.

Liu L, Zhang Y, Li X, Wang Y, Zhang L (2025) Evaluating *Beauveria bassiana* strains for insect pest control and endophytic colonization in wheat. **Insects** 16:183.

Lu H, Wu Z, Xu Y, Wang H, Liu Y (2021) A critical review on communication mechanism within plant-endophytic fungi interactions to cope with biotic and abiotic stresses. **Journal of Fungi** 7:719.

Lucini T, Panizzi AR, De F Bueno A (2021) Evaluating resistance of the soybean block technology cultivars to the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). **Journal of Insect Physiology** 131:104236.

Lugtenberg BJJ, Caradus JR, Johnson LJ (2016) Fungal endophytes for sustainable crop production. **FEMS Microbiology Ecology** 92:fiw194.

Messina M (2022) Perspective: soybeans can help address the caloric and protein needs of a growing global population. **Frontiers in Nutrition** 9:873415.

Mwamburi LA (2021) Endophytic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae,* confer control of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), in two tomato varieties. **Egyptian Journal of Biological Pest Control** 31:146.

Okosun OO, Fadamiro HY, Niassy S, Subramanian S (2024) Biology, ecology, and management of redbanded stink bug (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Integrated Pest Management** 15:8.

Ortiz-Urquiza A, Keyhani NO (2010) Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology** 105:270-278.

Panizzi AR (1997) Wild hosts of pentatomids: ecological significance and role in their pest status on crops. **Annual Review of Entomology** 42:99-122.

Panizzi AR, Lucini T, Aldrich JR (2022) Dynamics in pest status of phytophagous stink bugs in the Neotropics. **Neotropical Entomology** 51:18–31.

Peng D, Zhang H, Zhang Y, Yu L, Chen M, Chen JM, You L, Li P, Liu J, Zhang X, Arvor D, Kuchler P, Huang J, Zhang H, Hao P, Huang J (2025) Global soybean trade dynamics: Drivers, impacts, and sustainability.

Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM (2012) Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** 28:489-521.

Poudel M, Mendes R, Costa LAS, Bueno CG, Meng Y, Folimonova SY, Garrett KA, Bonito G (2021) The role of plant-associated bacteria, fungi, and viruses in drought stress mitigation. **Frontiers in Microbiology** 12:743512.

Ramírez-Ordorica A, Cossio-Bayúgar R, Quesada-Moraga E (2024) Volatile semiochemicals emitted by *Beauveria bassiana* modulate larval feeding behavior and food choice preference in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Fungi** 10:356.

Ramos Y, Taibo AD, Jiménez J, Portal O (2020) Endophytic establishment of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in maize plants and its effect against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Egyptian Journal of Biological Pest Control** 30:98.

Rehner SA, Buckley E (2005) A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. **Mycologia** 97:84-98.

Bueno A de F, Corrêa-Ferreira BS, Sosa-Gómez DR, Panizzi AR (2013) **Quando se deve controlar percevejos na soja?** Londrina: Embrapa Soja. Disponível em:https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/964691/1/Quandosedevecontrolarpercevejosnasoja.pdf. Acesso em: 5 fev. 2026.

Roggia S, Sosa-Gómez DR, Hoffmann-Campo CB, Corrêa-Ferreira BS (2014) **Circular técnica 137**. Londrina: Embrapa Soja.

Russo ML, Jaber LR, Scorsetti AC (2019) Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean Glycine max (L.) Merr. growth and yield. **Journal of King Saud University** - Science 31:728-736.

Saluso A, Salas G, Avalos DS (2011) An invasive pentatomid pest in Argentina: Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology** 40:704-705.

Shehzad M, Tariq M, Siddiqui JA (2025) Entomopathogenic fungi: Natural biocontrol of insects, challenges under climate change, advancements and future prospects in modern agriculture.

Silva FAC, Silva JJ, Cividanes FJ (2012) Feeding activity, salivary amylase activity, and superficial damage to soybean seed by adult *Edessa meditabunda* (F.) and *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology** 41:386-390.

Sinno M, Ranesi M, Di Lelio I, Iacomino G, Becchimanzi A, Barra E, Molisso D, Pennacchio F, Digilio MC, Vitale S, Turrà D, Harizanova V, Lorito M, Woo SL (2021) Selection of endophytic *Beauveria bassiana* as a dual biocontrol agent of tomato pathogens and pests. **Pathogens** 10:1242.

Souza ES, Silva JJ, Cividanes FJ, Parra JRP (2017) Variable levels of resistance of soybean genotypes on the performance of *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Economic Entomology** 110:2672-2678.

Tessmer MA, Azevedo Kuhn TM de, Appezzato-da-Glória B, et al. (2022) Histology of damage caused by *Euschistus heros* (F.) nymphs in soybean pods and seeds. **Neotropical Entomology** 51:112–121.

Tibola CM, Silva FAC, Silva JJ, Cividanes FJ (2021) Monitoring resistance of *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae) to insecticides by using encapsulated artificial diet bioassay. **Insects** 12:605.

Timbó RV, Silva FAC, Silva JJ, Parra JRP (2014) Biochemical aspects of the soybean response to herbivory injury by the brown stink bug *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). **PLoS ONE** 9:e107298.

Tuelher ES, Guedes RNC, Oliveira EE, Ferreira GH (2018) Area-wide spatial survey of the likelihood of insecticide control failure in the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. **Journal of Pest Science** 91:849-859.

United States Department of Agriculture – Foreign Agricultural Service (2024) **Production – soybean data**. Disponível em: https://www.fas.usda.gov/data. Acesso em: 13 fev. 2026.

Vargas-Almendra A, Mendez-Morales J, Torres-Pacheco I, Guevara-Gonzalez RG, Rico-Garcia E (2024) Advances in soybean genetic improvement. **Plants** 13:3172.

Vieira Filho JEA (2024) A produção de soja e sua importância na economia brasileira. **Revista de Política Agrícola** 33:1-15.

Villas Boas GL, Panizzi AR (1980) Biologia de *Euschistus heros* (Fabricius 1798) em soja (Glycine max (L.) Merrill). **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira** 9:105-113.

Walling LL (2000) The myriad plant responses to herbivores. **Journal of Plant Growth Regulation** 19:195-216.

Wang X, Liu Y, Li Z, Li Y, Zhang Y (2024) Biological and physiological effects in *Bemisia tabaci* feeding on tomatoes endophytically colonized by *Beauveria bassiana*. **Pest Management Science** 80:4085-4097.

Wang Y, Liu J, Zhang X, Li X, Zhang Y (2021) Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses. **International Journal of Molecular Sciences** 22:729.

Wei QY, Li Z, Li Y, Zhang Y, Liu X (2020a) Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* increases the resistance of tomatoes against *Bemisia tabaci*. **Arthropod-Plant Interactions** 14:289-300.

Wei QY, Li Z, Li Y, Zhang Y, Liu X (2020b) Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* increases the resistance of tomatoes against *Bemisia tabaci.* **Arthropod-Plant Interactions** 14:289-300.

Zimmermann G (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol Science and Technology 17:553-596.

Zvereva EL, Lanta V, Kozlov MV (2010) Effects of sap-feeding insect herbivores on growth and reproduction of woody plants: a meta-analysis of experimental studies. Oecologia 163:285-296.

CAPÍTULO 2- COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE SOJA POR *Beauveria amorpha* ESTÁ ASSOCIADA À MORTALIDADE DE *Euschistus heros*

Resumo: A colonização endofítica de plantas por fungos entomopatogênicos tem emergido como uma estratégia promissora para o manejo sustentável de insetos-praga. Entretanto, estudos envolvendo percevejos sugadores e espécies do gênero Beauveria além de *Beauveria bassiana* ainda são escassos. Neste estudo, avaliou-se a capacidade de *Beauveria amorpha* de colonizar endofiticamente plantas de soja e seu efeito sobre o percevejo-marrom *Euschistus heros*. O isolado fúngico UFSM-01 foi identificado como *B. amorpha* por análise filogenética baseada em sequências concatenadas da região ITS e do gene RPB1. Plantas de soja foram inoculadas com suspensão de conídios e, após sete dias, expostas a adultos de *E. heros* durante sete dias. A colonização endofítica foi confirmada por reisolamento do fungo e por PCR em folhas e raízes. A presença de *B. amorpha* também foi investigada molecularmente em insetos alimentados nas plantas inoculadas. *Beauveria amorpha* colonizou sistemicamente os tecidos vegetais, apresentando elevadas taxas de colonização foliar e colonização consistente das raízes. A mortalidade *de E. heros* foi significativamente maior em plantas inoculadas (70%) do que em plantas não inoculadas (27%), sendo observada redução expressiva da sobrevivência ao longo do tempo. Além disso, o DNA de *B. amorpha* foi detectado exclusivamente nos insetos provenientes das plantas inoculadas, enquanto nenhuma amplificação foi observada nos insetos alimentados em plantas controle. Os resultados fornecem evidências consistentes de um processo de transferência planta–inseto associado à alimentação em tecidos colonizados e demonstram, pela primeira vez, que *B. amorpha* pode atuar como endófito funcional em soja, estando associada à elevada mortalidade de *E. heros*.

Palavras-chave: fungo entomopatogênico endofítico, confirmação endofítica, controle biológico; percevejo-marrom-da-soja;

1. Introdução

Os fungos entomopatogênicos têm sido amplamente utilizados no controle biológico de insetos-praga, principalmente por meio de aplicações diretas sobre os hospedeiros via pulverizações (Cheong et al., 2020; Clifton et al., 2023; Ortiz-Urquiza et al., 2010; Zimmermann, 2007). Novas abordagens têm explorado o estabelecimento desses microrganismos como endófitos em plantas, promovendo efeitos letais e subletais sobre insetos herbívoros (Aravinthraju et al., 2024; Bhunjun et al., 2024; Liao et al., 2025; L. Liu et al., 2025; Mwamburi, 2021; Sinno et al., 2021). Embora diversos estudos relatem alterações comportamentais, alimentares e no desempenho de insetos-praga associados à colonização endofítica por fungos entomopatogênicos (Geedi et al., 2023; George et al., 2024; González-Mas et al., 2021; Lugtenberg et al., 2016; Wei et al., 2020a) ainda são escassas as evidências de mortalidade em insetos sugadores decorrente da alimentação em tecidos vegetais colonizados (Aravinthraju et al., 2024; Vega, 2018). Em especial, a aquisição do fungo por meio da alimentação, sem dependência de contato cuticular ou de aplicações diretamente sobre os insetos, permanece pouco documentada (Lacey et al., 2015). Nesse contexto, insetos de hábito sugador ainda representam um desafio para a utilização de fungos entomopatogênicos endofíticos em programas de controle biológico e uma importante fronteira para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis de manejo de pragas.

Euschistus heros (Pentatomidae) representa uma das principais pragas da cultura da soja no Brasil e na América do Sul, sendo responsável por perdas significativas de produtividade e qualidade dos grãos (Bueno et al., 2013; de F. Bueno et al., 2024). Seu manejo tem sido historicamente baseado no uso intensivo de inseticidas químicos, estratégia que enfrenta desafios crescentes, incluindo a evolução da resistência a diferentes grupos de ingredientes ativos, a redução das janelas de controle e a necessidade de múltiplas aplicações ao longo do ciclo da cultura (Guedes, 2017; Tuelher et al., 2018). Além disso, seu hábito alimentar sugador reduz a eficiência de diversas táticas de controle baseadas no contato direto com o inseto (Divelyet al., 2020). Nesse cenário, existe uma demanda crescente por alternativas que reduzam a dependência de

aplicações externas e ampliem as possibilidades de manejo dessa praga, especialmente por meio de estratégias capazes de atuar durante o processo alimentar (Preisegger et al., 2025; Vega, 2018). Abordagens com esse perfil apresentam potencial para reduzir o uso de inseticidas e de água associada às pulverizações, contribuindo para sistemas agrícolas mais sustentáveis e alinhados aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) propostos pela Organização das Nações Unidas.

Fungos entomopatogênicos endofíticos representam candidatos promissores para preencher essa lacuna. Uma vez estabelecidos nos tecidos vegetais, esses microrganismos permanecem mais protegidos da ação de fatores ambientais adversos e podem reduzir a dependência de aplicações frequentes, favorecendo o uso mais eficiente de água e insumos agrícolas (Hu & Bidochka, 2021b; Mantzoukas & Eliopoulos, 2020a; Vega et al., 2008). Além disso, a colonização endofítica cria a possibilidade de interação direta entre fungos e insetos herbívoros durante o processo alimentar, constituindo uma rota potencial de exposição ainda pouco explorada para insetos sugadores (Gange et al., 2019; George et al., 2024). Caso efetiva, essa estratégia poderá ampliar as alternativas disponíveis para o manejo integrado de pragas e contribuir para a redução da dependência exclusiva de inseticidas químicos.

Os estudos envolvendo fungos entomopatogênicos endofíticos concentram-se predominantemente em espécies como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium* spp. (Altaf et al., 2023; Russo et al., 2019; Wei et al., 2020b). Entretanto, a busca por novas espécies com potencial para associação endofítica e controle de insetos-praga tem recebido crescente atenção, visando ampliar as alternativas disponíveis para programas de manejo biológico (Herlinda et al., 2021). Nesse contexto, *Beauveria amorpha* destaca-se como uma espécie promissora, embora ainda pouco explorada sob a perspectiva ecológica e aplicada. Registros de sua ocorrência em solos, plantas e artrópodes evidenciam sua ampla distribuição e sugerem potencial para aplicações em manejo de pragas (Campos et al., 2005; D. A. de Souza et al., 2020). Considerando a elevada proximidade filogenética entre espécies do gênero *Beauveria*, a utilização de ferramentas moleculares torna-se essencial para garantir a correta identificação dos isolados empregados em estudos

ecológicos e aplicados, aumentando a confiabilidade dos resultados experimentais e das inferências biológicas obtidas (Hyde et al., 2010; Rehner & Buckley, 2005).

Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a colonização endofítica de plantas de soja por Beauveria amorpha e investigar seus efeitos sobre *E. heros*. Especificamente, buscou-se verificar a persistência do fungo nos tecidos vegetais, avaliar a sobrevivência dos insetos alimentados em plantas inoculadas e investigar a associação entre a colonização vegetal e a presença do fungo nos insetos expostos. Com isso, pretende-se ampliar o conhecimento sobre o potencial de fungos entomopatogênicos endofíticos no manejo de insetos sugadores de importância agrícola.

2. Material e métodos

2.1. Criação de insetos

Os insetos utilizados neste estudo foram provenientes da criação mantida no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes-Praga (LCMAP), Universidade Estadual Paulista (UNESP/FCAV), Jaboticabal, SP, Brasil. A criação iniciou em maio de 2022 e reforçada por novas introduções nos anos seguintes. Os insetos foram mantidos em caixas plásticas com tampa de tecido voil, que permitia ventilação adequada e evitava a fuga. A dieta para alimentação foi composta por vagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e grãos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), complementada por chumaços de algodão embebidos em água deionizada. Tecidos de algodão cru foram dispostos nas laterais das gaiolas para oviposição. A manutenção da criação foi realizada duas vezes por semana. Os insetos foram mantidos sob condições controladas de temperatura (26 ± 1 °C), umidade relativa (70 ± 10%) e fotoperíodo (14h luz :10h escuro), conforme metodologia descrita por (Cavalcante Silva et al., 2008).

2.2. Escolha e identificação do isolado fúngico de *Beauveria amorpha*

O fungo *Beauveria* utilizado neste experimento foi selecionado de um projeto de prospecção para o controle de *E. heros* e inicialmente identificado como *Beauveria bassiana,* isolado UFM01, depositado na coleção de microrganismo da Universidade Federal de Santa Maria, SC, Brasil (Dalla Nora et al., 2021). No entanto, ele foi submetido à uma nova identificação molecular e reclassificado como *Beauveria amorpha* (processo de publicação no NCBI (GenBank)). Para isso, o isolado foi cultivado em meio líquido Batata-Dextrose (BD) e incubado por sete dias em estufa do tipo B.O.D. a 27 °C ± 1 °C. Após este período, a massa micelial foi peneirada, lavada com água ultrapura e seca em estufa a 50 °C por 12 horas. Em seguida, o micélio foi macerado em nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino, do qual 0,1 g foram transferidos para microtubos de 2,0 mL. A extração de DNA foi realizada conforme (Eurya Kuramae-Izioka, 1997).

Para o sequenciamento foram amplificadas a região ITS1-5.8S-ITS4 e o gene RPB1 (RNA Polymerase II Largest Subunit). A amplificação da região ITS foi conduzida utilizando os oligonucleotídeos ITS1 (5’-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3’) e ITS4 (5’-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3’)(White et al., 1990) gerando um fragmento de aproximadamente 650 pb. Para o gene RPB1, utilizaram-se os oligonucleotídeos RPB1Af (5’-GAR TGY CCD GGD CAY TTY GG-3’) e RPB1Cr (5’-CCN GCD ATN TCR TTR TCC ATR TA-3’) (Stiller & Hall, 1997), gerando um fragmento de aproximadamente 1000 pb. As reações de amplificação foram compostas por tampão 1X (KCl 50mM, TRIS-HCl 200mM, pH 8,4); 2mM de $MgCl_2$; 0,2mM de dNTP’s; 0,5 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen); 2,5 pmol de cada primer; 60 ng de DNA genômico e água pura estéril para 20 µL. As amplificações ocorreram em um termociclador Nexus (Eppendorf) programado para realizar um ciclo a 95ºC por 2 minutos e 30 segundos, 35 ciclos a 94ºC por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72ºC por 40 segundos, seguido de um ciclo final a 72ºC por 10 minutos.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado por eletroforese de capilar em um sequenciador ABI3730 (Applied Biosystems). Os eletroferogramas gerados foram submetidos ao pacote de programas Phred/Phrap/Consed (Ewing; Green, 1998; Gordon; Abajian; Green, 1998; Green, 1996) para verificação da qualidade de bases e corte das extremidades das sequências, levando-se em consideração bases com qualidade Phred igual ou superior a 20. As sequências qualificadas foram comparadas a outras sequências depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) por meio da ferramenta BLAST (Altschup et al., 1990)

Para obtenção da árvore filogenética, as sequências de cada região gênica, ITS e RPB1 do isolado do estudo e de demais sequências espécies-tipo do banco de dados do NCBI foram alinhadas separadamente utilizando-se a ferramenta MUSCLE (Edgar, 2004) e, posteriormente, concatenadas para a análise filogenética, que foi realizada utilizando-se o modelo evolutivo selecionado de acordo com o critério de informação de Akaike (AIC) utilizando-se a ferramenta ModelTest 3.7 (Posada & Buckley, 2004; Posada & Crandall, 1998) por análise bayesiana utilizando-se o algoritmo *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) pelo *software* MrBayes 3.2.3 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). O modelo evolutivo utilizado foi correspondente ao tipo de substituição 6 e distribuição gamma. As análises foram realizadas em quatro cadeias com 2.000.000 de gerações, sendo as árvores amostradas a cada 100 gerações. Ao final das análises, obtendo-se desvio padrão inferior a 0,01, 25% das árvores geradas inicialmente foram descartadas. O filograma obtido foi editado graficamente pelo *software* Dendroscope 3 (Huson & Scornavacca, 2012).

2.3. Implementação do experimento casa de vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação com sementes de soja não transgênica (*Glycine max* L. Merr.), cultivar BRS-544 RR, fornecidas pela Embrapa Soja (Londrina, PR, Brasil).

As sementes foram esterilizadas com etanol 70% por 1 min, e imersas em hipoclorito de sódio a 6% por 30 segundos e enxágue triplo com água destilada estéril. Após a limpeza, as sementes foram secas em papel filtro dentro de uma câmara de fluxo laminar. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos: (1) controle (sem fungo e sem inseto); (2) plantas inoculadas com *Beauveria amorpha*; (3) plantas infestadas com *Euschistus heros*; e (4) plantas inoculadas e posteriormente infestadas com *E. heros*. Para os tratamentos com infestação, foram utilizadas 10 plantas por tratamento. Em cada planta foram liberados 10 fêmeas e cinco machos recém-emergidos de *E. heros*, totalizando 15 insetos por planta e 150 insetos por tratamento.

A inoculação fúngica foi realizada por meio de tratamento de sementes com uma suspensão de 1×10^7 conídios mL^{-1} (concentração definida em pré-testes), seguida de aplicação foliar na mesma concentração. As sementes foram submersas por duas horas na suspensão de conídios com 0,005% de Tween 80. Sementes do tratamento ‘controle’ e tratamento ‘planta com fungo e inseto’ foram imersas em água deionizada estéril contendo 0,005% de Tween 80. Após a imersão, as sementes foram semeadas em bandejas contendo substrato autoclavado (BIOMIX®), previamente esterilizado três vezes a 120 °C por 20 min, garantindo um ambiente asséptico e desenvolvimento uniforme das plântulas. Após a germinação das sementes na bandeja, assim que a plântula atingiu o estágio V1 (o primeiro trifólio totalmente expandido), elas foram transplantadas para vasos de 5 L contendo mistura esterilizada de areia, esterco bovino e latossolo vermelho-escuro (1:1:2). A fertilidade do solo foi analisada e corrigida conforme as recomendações do Boletim 100 do Instituto Agronômico de Campinas (Instituto Agronômico de Campinas, 2022).

Quando a planta atingiu o estágio V3 (três trifólios totalmente expandidos) foi realizado a inoculação foliar de *B. amorpha* com o auxílio de um pincel macio com cerdas volumosas, aplicando a suspensão fúngica em toda superfície abaxial das folhas, usando a usando metodologia adaptada de Marassatto et al, (2025). As folhas do tratamento ‘controle’ e tratamento ‘planta com fungo e inseto’ foram pinceladas na parte abaxial da folha com água deionizada estéril contendo 0,005% de Tween 80.

2.4. Bioensaio com *Euschitus heros* em plantas de soja

Para favorecer o estabelecimento endofítico de *Beauveria amorpha* nos tecidos vegetais, os insetos foram introduzidos nas plantas sete dias após a inoculação foliar do fungo, período semelhante ao adotado em estudos envolvendo fungos entomopatogênicos endofíticos (Greenfield et al., 2016; Russo et al., 2015a, 2015b). Procedimento semelhante, com exposição dos insetos após o estabelecimento da colonização vegetal, tem sido adotado em estudos com fungos entomopatogênicos endofíticos (George et al., 2024; Gurulingappa et al., 2010; Sánchez-Rodríguez et al., 2018; Wei et al., 2020b).

Após esse período, 10 fêmeas e cinco machos recém-emergidos de *Euschistus heros* foram transferidos para cada planta. As plantas (com e sem insetos) foram mantidas individualmente em gaiolas metálicas (80 × 100 cm) revestidas com tecido voil, permitindo ventilação adequada e impedindo a fuga dos insetos. Os insetos permaneceram nas plantas por sete dias, sendo avaliados diariamente quanto à mortalidade. Os indivíduos mortos durante esse período foram armazenados em freezer a −20 °C para posterior análise molecular. Ao término da exposição, os insetos sobreviventes foram transferidos para o laboratório para avaliações complementares relacionadas à biologia do inseto, enquanto as plantas foram destinadas às análises moleculares.

2.5. Confirmação de inoculação de *Beauveria amorpha* em tecidos vegetais de soja

Para avaliar a presença ou a ausência de colonização fúngica nos tecidos vegetais da soja, foram utilizadas duas plantas por tratamento. De cada planta, uma folha de cada trifólio foi coletada e agrupada (pool) para a análise. As amostras foliares foram esterilizadas superficialmente em álcool 70% por 2 minutos, seguidas de imersão em hipoclorito de sódio a 6% por 1 minuto, e posteriormente enxaguadas três vezes com água destilada estéril. O

procedimento seguiu o método descrito por (Russo et al., 2019), com adaptações. Em câmara de fluxo laminar, as folhas de cada tratamento foram cortadas com tesoura previamente esterilizada em fragmentos de aproximadamente 1 cm². Cinco fragmentos foliares foram depositados em placas de Petri contendo meio CTC (composto por extrato de levedura, batata, dextrose, ágar, cloranfenicol, cicloheximida e tetraciclina), com duas réplicas/placas por tratamento. As placas foram mantidas a 26 °C em câmara de crescimento tipo B.O.D. O crescimento fúngico foi avaliado entre 10 e 15 dias após a incubação.

As colônias emergentes foram examinadas microscopicamente para confirmação morfológica de *B. amorpha*. A colonização endofítica foi expressa como frequência de colonização (FC), calculada pela fórmula: FC = (número de pedaços de plantas colonizados / número total de pedaços de plantas examinados) × 100 (Petrini & Fisher, 1986).

2.6. Identificação molecular da presença e ausência de *Beauveria amorpha* nas plantas e insetos

Amostras de folhas e raízes das plantas de soja utilizadas nos experimentos foram submetidas à extração de DNA visando à identificação molecular de *B. amorpha* endofítica. Após a retirada dos insetos das plantas, as folhas e raízes foram coletadas e inicialmente lavadas em água corrente com detergente neutro para remoção de sujidades superficiais. Em seguida, o material foi submetido à desinfestação superficial por imersão em etanol 70% por 1 min, seguida de hipoclorito de sódio 0,5% por 1 min. Após a desinfestação superficial, os tecidos foram enxaguados três vezes em água ultrapura estéril e secos em papel toalha estéril antes do processamento. Para cada tratamento, foram amostradas cinco folhas por repetição, previamente lavadas com sabão neutro em água corrente e secas com papel toalha. Em seguida, as folhas foram colocadas em almofariz, congeladas com nitrogênio líquido e maceradas. De cada amostra macerada, foram transferidos aproximadamente 250 mg para microtubos de 2,0 mL. O mesmo procedimento foi adotado para as raízes, utilizando-se um volume de material equivalente à metade das raízes das mudas.

Para a lise celular, foram adicionados 800 µL de tampão de extração de DNA aos microtubos contendo os macerados vegetais. O tampão foi composto por 160 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 60 mM de EDTA (pH 8,0), 20 mM de NaCl, 0,5% de CTAB, 1% de PVP e 0,2% de β-mercaptoetanol.

As extrações de DNA dos *E. heros* foram realizadas em grupos de cinco indivíduos por repetição, totalizando três repetições por tratamento. Esses insetos foram os coletados durante o período de avaliação da mortalidade. Os tratamentos consistiram em insetos mantidos em contato com plantas inoculadas e insetos mantidos em contato com plantas não inoculadas. Previamente às extrações, os insetos foram lavados por agitação em vórtex em tampão fosfato-salino (PBS 1X) esterilizado, com o objetivo de remover vestígios de esporos e outras sujidades presentes na superfície dos insetos. A maceração dos cinco insetos que compuseram cada grupo foi realizada em conjunto, utilizando-se nitrogênio líquido e pistilo em almofariz. Todo o material macerado foi então transferido para microtubos de 2,0 mL, aos quais foram adicionados 800 µL do tampão de extração de DNA, composto por: 160 mM Tris-HCl (pH 8,0), 60 mM EDTA (pH 8,0), 20 mM NaCl, 0,5% SDS e 1% PVP.

As extrações de DNA das plantas e dos insetos foram finalizadas seguindo o mesmo procedimento. As amostras foram agitadas em vórtex e incubadas a 65°C por 60 minutos. Após a lise, adicionaram-se 250 µL de acetato de potássio 5 M, com homogeneização por inversão e incubação em gelo por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 × g por 10 minutos a 10°C. O sobrenadante foi transferido para microtubos novos, aos quais se adicionaram 700 µL de uma solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v). A mistura foi agitada em vórtex e centrifugada novamente sob as mesmas condições. O sobrenadante obtido foi transferido para novos microtubos, e o DNA foi precipitado com 1.000 µL de etanol absoluto, sendo as amostras mantidas a −20°C por 12 horas. A precipitação do DNA foi seguida de centrifugação a 12.000 × g por 20 minutos a 10°C. O sobrenadante foi completamente descartado, e o pellet de DNA foi lavado com 1.000 µL de etanol 70%, seguido de nova centrifugação. O pellet final foi seco a 50°C por 30 minutos e ressuspendido em 40 µL de solução TE 10:1 (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM de EDTA, pH 8,0).

A quantificação e a avaliação da pureza do DNA foram realizadas com auxílio de um espectrofotômetro NanoDrop One (Thermo Scientific), por meio da leitura das absorbâncias a 260 e 280 nm. A razão entre essas leituras (A_{260}/A_{280}) foi utilizada como indicador de pureza, sendo valores entre 1,8 e 2,0 considerados representativos de DNA de alta qualidade (Sambrook & Russell, 2001).

Para a identificação da presença de *B. amorpha* nas amostras de DNA, foi utilizado um conjunto de oligonucleotídeos específicos, BB.fw/BB.rv (5' – GAA CCT ACC TAT CGT TGC TTC – 3' e 5' – ATT CGA GGT CAA CGT TCA G – 3'), que amplificam de um fragmento de 464 pb. Esses primers foram inicialmente desenvolvidos para a espécie *B. bassiana*(Landa et al., 2013), a partir da região ITS rDNA, mas se mostraram capazes de amplificar para esta espécie após testes utilizando o isolado previamente identificado por sequenciamento.

As reações de amplificação foram compostas por tampão 1X (KCl 50mM, TRIS-HCl 200mM, pH 8,4); 2mM de MgCl 2; 0,2mM de dNTP's; 0,5 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen); 2,5 pmol de cada primer; BSA 0,01 mg, 1 µL de DNA genômico dos tecidos vegetais ou dos insetos (aproximadamente 200 ng/µL) e água pura estéril para 20 µL. As amplificações foram realizadas em um termociclador Nexus (Eppendorf) programado para realizar um ciclo a 95ºC por 2 minutos e 30 segundos, 35 ciclos a 94ºC por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72ºC por 40 segundos, seguido de um ciclo final a 72ºC por 10 minutos. A fim de assegurar a detecção da presença endofítica do fungo nas plantas e nos insetos, mesmo em baixa concentração, o produto de PCR foi submetido a uma reamplificação, empregando-se as mesmas condições da reação inicial. A reamplificação foi empregada exclusivamente para aumentar a sensibilidade da detecção em tecidos vegetais e insetos, onde a carga fúngica é reconhecidamente baixa, sem alterar a especificidade da reação. Os produtos amplificados foram visualizados sob luz UV após eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

2.7. Análise de dados

O número médio de *Euschistus heros* vivos ao final do período experimental de cada tratamentos foram comparadas por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey a 5% de probabilidade. A sobrevivência ao longo do tempo foi avaliada por curvas de Kaplan–Meier (Kaplan & Meier, 1958), e as diferenças entre tratamentos foram comparadas pelo teste log-rank (Mantel–Cox), utilizando a função survdiff**,** do pacote survival do software R(Therneau, 2023). Todas as análises estatísticas foram realizadas no ambiente R (R Core Team, 2024), considerando-se P ≤ 0,05. Os dados de identificação molecular do isolado fúngico foram analisados de forma qualitativa e inferencial. As sequências obtidas das regiões ITS e RPB1 foram avaliadas quanto à qualidade, comparadas com sequências de referência disponíveis no NCBI para confirmação taxonômica, e utilizadas para inferência filogenética por abordagem bayesiana com base em sequências concatenadas, conforme recomendado para o gênero *Beauveria* (Rehner & Buckley, 2005; Ronquist et al., 2012; Ronquist & Huelsenbeck, 2003). A detecção de *Beauveria amorpha* em plantas e insetos por PCR foi interpretada de forma qualitativa, considerando a presença ou ausência de amplificação específica (White et al., 1990).

3. Resultados

3.1. Identificação do isolado fúngico de *Beauveria amorpha*

De acordo com a análise filogenética bayesiana das sequências concatenadas da região ITS e do gene RPB1, o isolado UFSM-01 foi identificado como pertencente à espécie *Beauveria amorpha* (Figura 1). A comparação das sequências do isolado com aquelas disponíveis no banco de dados revelou uma identidade de 99,63% para a região ITS (558 pb) e de 99,43% para o gene RPB1 (750 pb), corroborando a identificação molecular proposta.

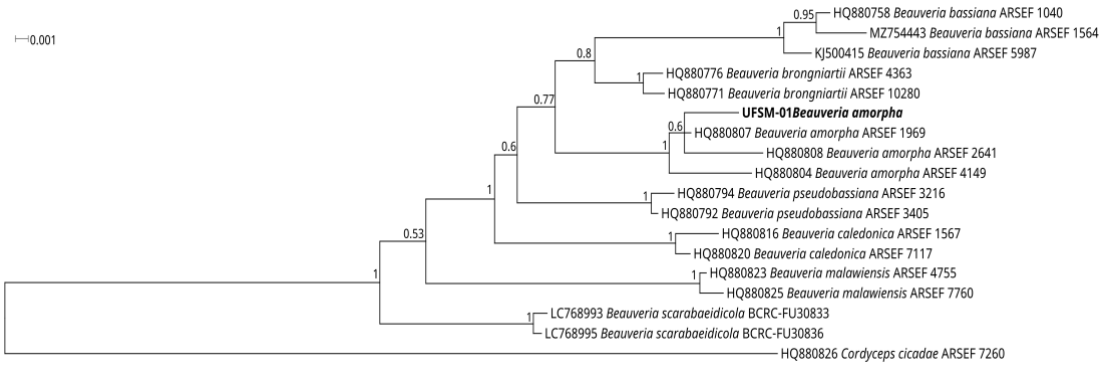


Figura 1. Árvore filogenética bayesiana obtida a partir das sequências concatenadas da região ITS e do gene RPB1 de espécies de *Beauveria*, utilizada para a identificação em nível de espécie do isolado UFSM-01. Os números nos entrenós representam os valores de suporte das inferências.

3.2. Mortalidade de *Euschitus heros* expostos a plantas de soja inoculadas com *Beauveria amorpha*

Os resultados do bioensaio com *Euschitus heros* em soja inoculada e não inoculada com *Beauveria amorpha* são apresentados na Figura 2 e 3.

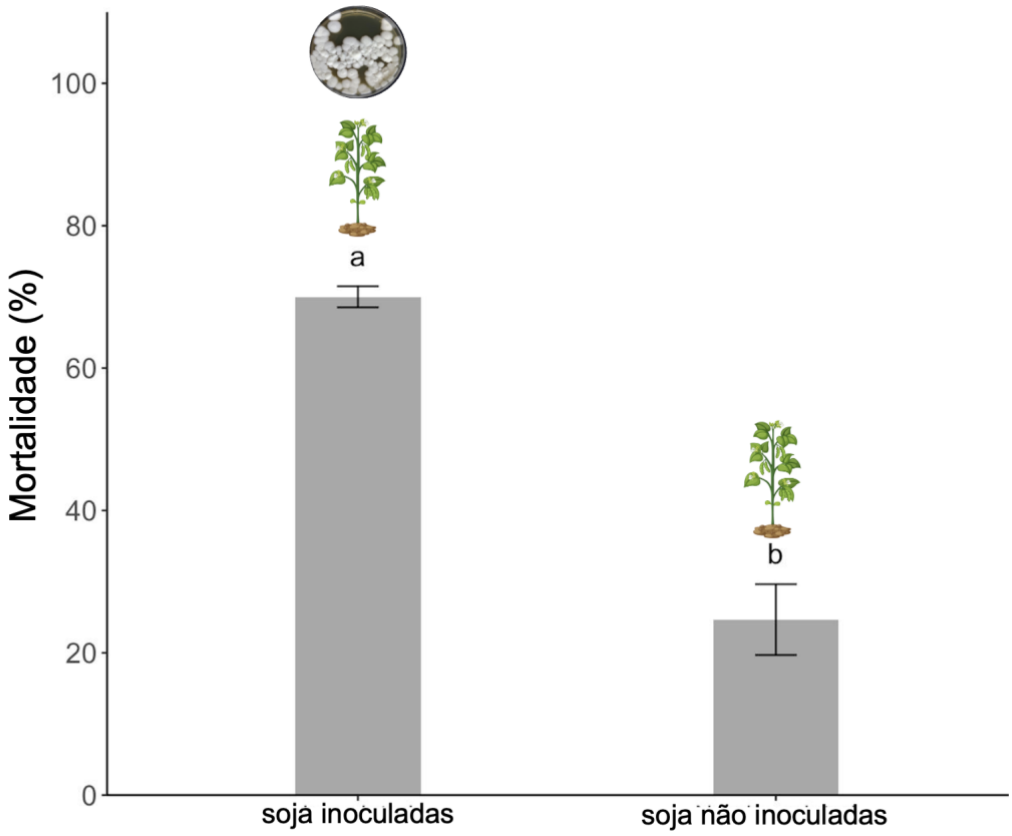


Figura 2. Mortalidade acumulada (%) de *Euschistus heros* após sete dias em contato com plantas de soja inoculadas ou não inoculadas com *Beauveria amorpha*. As barras representam a média ± erro-padrão da mortalidade por planta (n = 10 plantas por tratamento). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

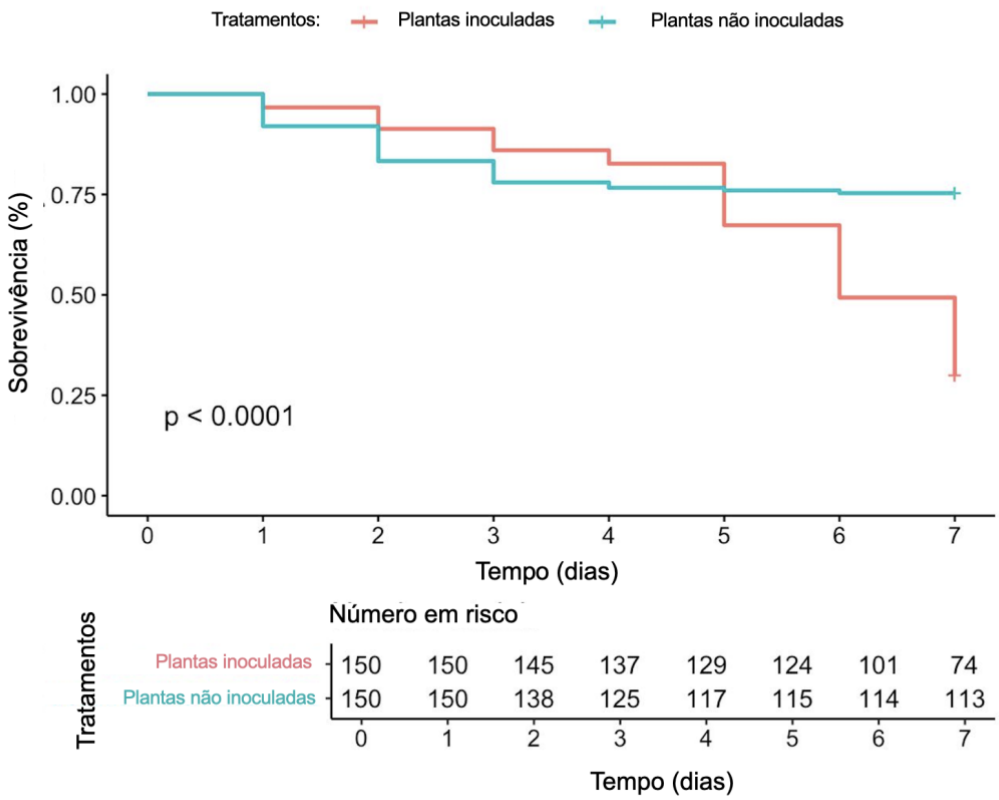


Figura 3. Curvas de sobrevivência de *Euschistus heros* alimentados em plantas de soja inoculadas ou não com *Beauveria amorpha*. As análises de sobrevivência foram realizadas considerando os insetos individualmente e estimadas pelo método de Kaplan–Meier e comparadas pelo teste de log-rank ($p < 0,0001$). O número de insetos em risco é apresentado abaixo das curvas.

A mortalidade de *Euschistus heros* foi maior em insetos alimentados em plantas de soja inoculadas com *Beauveria amorpha* (70%) em comparação aos alimentados em plantas não inoculadas (27%) (Figura 2). Ao final do período de avaliação, a mortalidade dos insetos que se alimentaram das plantas inoculadas com fungo foi cerca de três vezes superior à observada no tratamento controle, com diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

A análise de sobrevivência confirmou esse padrão ao longo do tempo (Figura 3). As curvas demonstraram redução da sobrevivência de *E.*

heros alimentados em plantas inoculadas com *B. amorpha*, em relação ao tratamento não inoculado. O teste de log-rank indicou diferença significativa entre as curvas ($p < 0,0001$), evidenciando que a exposição contínua a plantas colonizadas por *B. amorpha* comprometeu a sobrevivência dos insetos. O número de insetos sobreviventes diminuiu mais no tratamento com *B. amorpha*, refletindo o aumento acumulado da mortalidade ao longo dos dias de avaliação.

O delineamento experimental deste experimento previa a construção de uma tabela de vida baseada nos indivíduos remanescentes de cada tratamento. No entanto, essa análise não pôde ser realizada, pois, os percevejos que se alimentaram das plantas inoculadas com *B. amorpha* que sobreviveram até o final do período de avaliação, morreram no máximo três dias após serem transferidos para o laboratório**,** inviabilizando o acompanhamento de parâmetros subletais, como longevidade, fecundidade, oviposição e sobrevivência da prole. Em contraste, a maioria dos insetos que se alimentaram de plantas sem fungo apresentou longevidade normal, com sobrevivência média de aproximadamente 35 dias após o período experimental, tempo suficiente para completar a oviposição e originar descendentes, demonstrando ausência de efeitos letais ou subletais relevantes nessas condições.

3.3. Confirmação endofítica de *Beauveria amorpha* em tecidos vegetais da soja

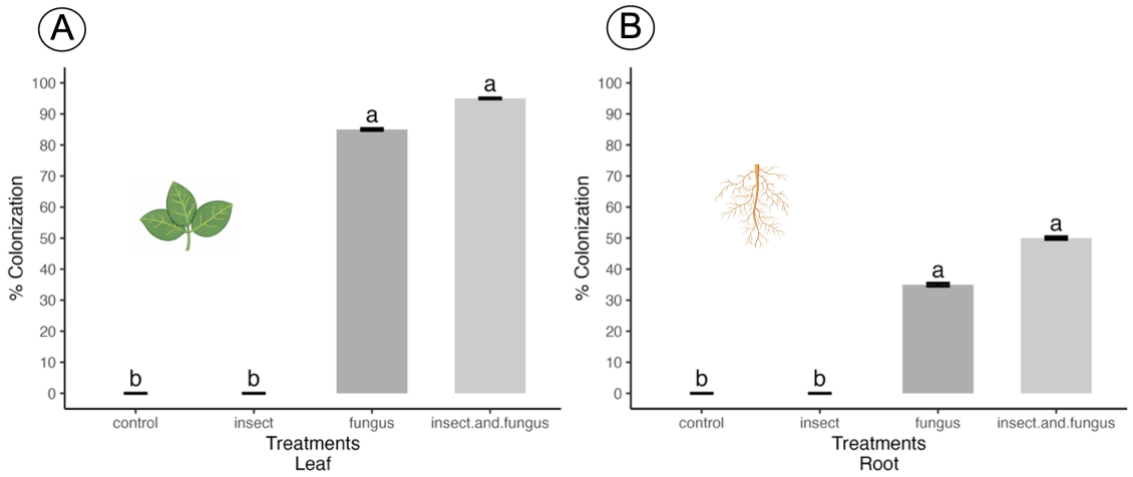


Figura 4. Colonização endofítica de *Beauveria amorpha* em plantas de soja. (A) Recuperação e confirmação do fungo a partir de folhas inoculadas, cultivadas em placas de Petri. (B) Recuperação e confirmação do fungo a partir de raízes inoculadas, cultivadas em placas de Petri. As médias foram comparadas pelo teste F, seguido pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi confirmado a colonização endofítica por *Beauveria amorpha* em plantas soja, com diferenças marcantes entre plantas inoculadas e não inoculadas (figura 4). Nos tecidos foliares (Figura 4A), a colonização foi ausente nos tratamentos controle e inseto. Por outro lado, ambos os tratamentos com inoculação fúngica mostraram colonização elevada e estatisticamente semelhante, variando entre aproximadamente 85–95%, evidenciando que o fungo se estabeleceu de forma eficiente nas folhas independentemente da presença do inseto. Padrão semelhante foi observado nas raízes (Figura 4B), onde novamente não houve colonização nos tratamentos controle e inseto. Nas plantas inoculadas com *B. amorpha*, a colonização radicular foi significativamente maior, com valores em torno de 35% no tratamento somente com fungo e aproximadamente 50% no tratamento fungo + inseto, embora ambos pertencentes ao mesmo grupo estatístico. Esses

resultados demonstram que o fungo coloniza raízes em menor intensidade que folhas, mas ainda assim de forma consistente.

3.4. Identificação molecular da presença de *Beauveria amorpha* nas plantas inoculadas e insetos

A identificação molecular de *B. amorpha* em plantas de soja inoculada e não inoculada com fungo e *Euschistus heros* são apresentados na Figura 4, 5 e 6.

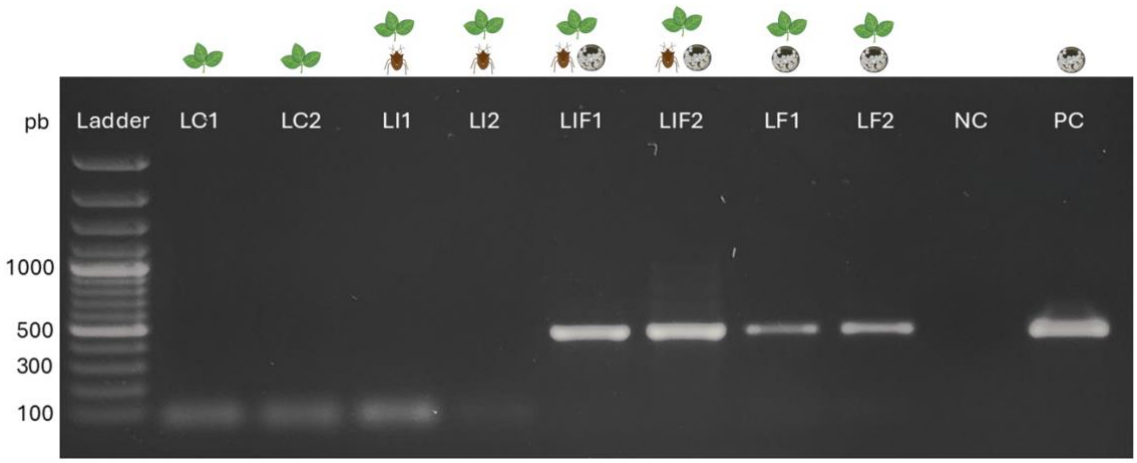


Figura 5. Produto da amplificação para identificação da presença de *Beauveria amorpha* nas amostras de folhas das plantas de soja submetidas aos ensaios de inoculação e exposição aos *Euschitus heros*. LC: folhas controle; LI: folhas expostas aos insetos; LIF: folhas expostas aos insetos e inoculadas com fungo; LF: folhas inoculadas com fungo; NC: controle negativo; PC: controle positivo (B. *amorpha*). Ladder: 100 pb DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific).

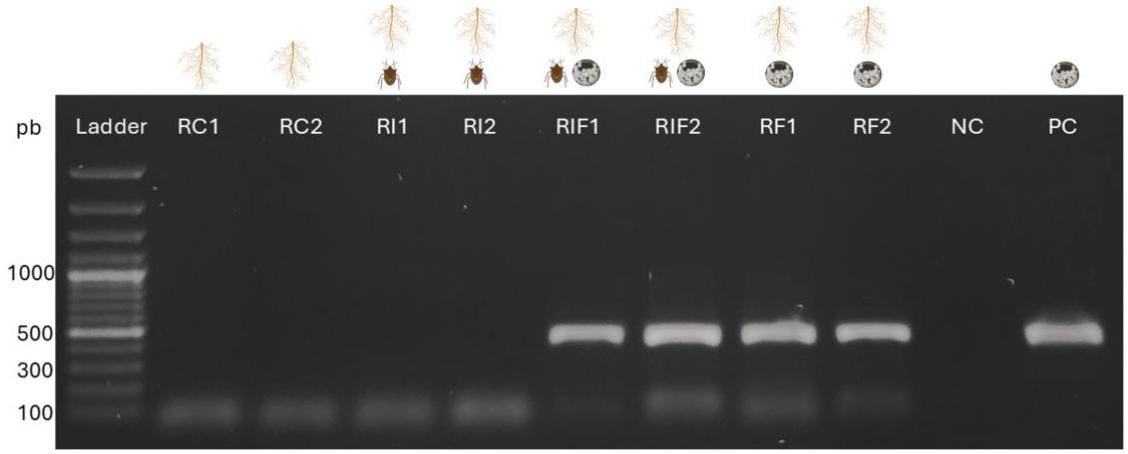


Figura 6. Produto da amplificação para identificação da presença de *Beauveria amorpha* nas amostras de raízes das plantas de soja submetidas aos ensaios de inoculação e exposição aos *Euschitus heros*. RC: folhas controle; RI: folhas expostas aos insetos; RIF: folhas expostas aos insetos e inoculadas com fungo; RF: folhas inoculadas com fungo; NC: controle negativo; PC: controle positivo (*B. amorpha* isolado UFSM01). Ladder: 100 pb DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific).

A análise por PCR confirmou por amplificação, que a espécie fúngica encontrada de forma endofítica nos tecidos vegetais (tópico 3.3) é o isolado UFSM01 de *B. amorpha*, e que a presença do DNA desta espécie foi encontrada apenas em plantas de soja submetidas à inoculação fúngica (Figuras 5 e 6).

Nas folhas (Figura 5), a sua presença foi observada apenas nos tratamentos LIF (folhas de plantas inoculadas e expostas a *Euschistus heros*) e LF (folhas de plantas inoculadas), enquanto as amostras controle (LC) e aquelas apenas expostas aos insetos, sem inoculação fúngica (LI), permaneceram negativas (Figura 5). Resultados equivalentes foram obtidos nas raízes (Figura 6), com amplificação detectada somente nos tratamentos RIF (raízes de plantas inoculadas com *B. amorpha* e expostas aos *E. heros*) e RF (raízes de plantas inoculadas com *B. amorpha*), e ausência de amplificação nos tratamentos controle (RC) e nas plantas não inoculadas expostas aos insetos (RI) (Figura 5). A concordância entre os resultados obtidos em folhas e raízes confirma a colonização sistêmica de *B. amorpha* nas plantas inoculadas. A ausência de

amplificação nos controles negativos (NC) e a correspondência com o controle positivo (PC) validam a especificidade das reações de PCR e sustentam o papel das plantas como fonte primária do fungo nos bioensaios subsequentes com *E. heros*.

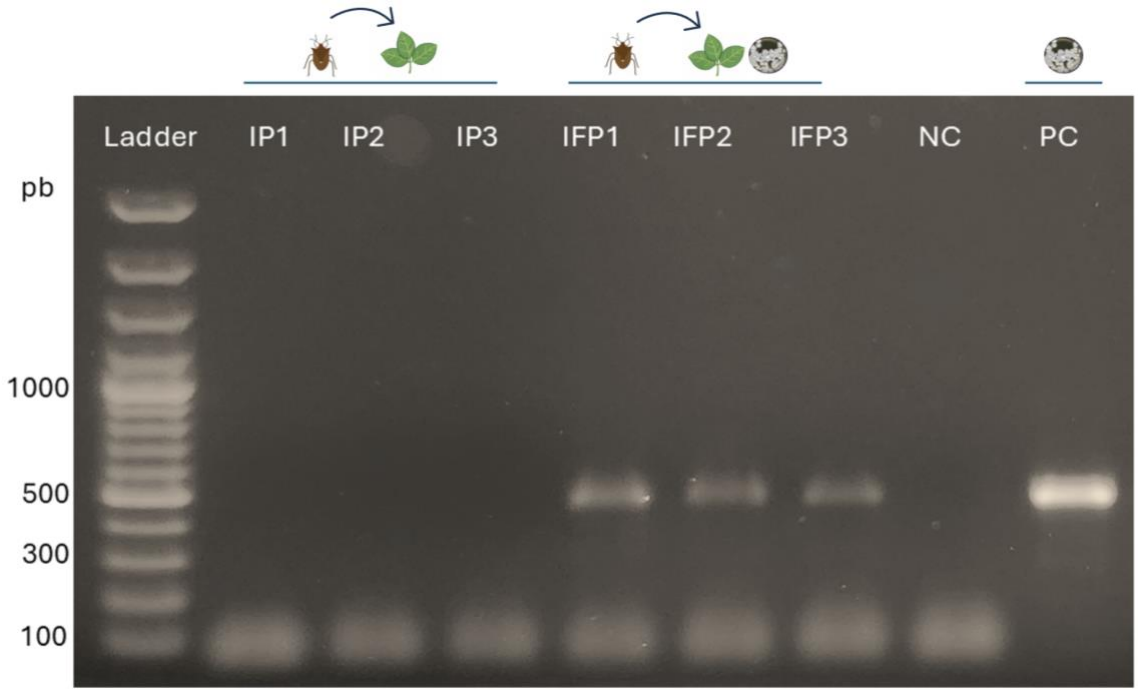


Figura 7. Produto da amplificação para identificação da presença de *Beauveria amorpha* em *Euschistus heros* que tiveram contato com plantas de soja submetidas aos ensaios de inoculação do *Beauveria amorpha*. IP: pool de DNA de cinco insetos que tiveram contato com plantas sem inoculação com o *B. amorpha*; IFP: pool de DNA de cinco insetos que estiveram em contato com plantas inoculadas com o *B. amorpha*; NC: controle negativo; PC: controle positivo (*Beauveria amorpha* isolado). Ladder: 100 pb DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific).

A confirmação molecular da presença ou ausência de *B. amorpha* em *E. heros* expostos a plantas com e sem inoculação reforçou a associação entre a infecção fúngica nos percevejos e a origem a partir da colonização endofítica das plantas (Figura 7). As análises por PCR realizadas nos insetos mortos revelaram a presença do fungo apenas nos indivíduos que se alimentaram de plantas inoculadas (IFP 1, 2 e 3), indicando fortes evidências de que o fungo foi adquirido durante a alimentação e posteriormente se estabeleceu no hospedeiro. Esse resultado está em concordância com as análises realizadas nos tecidos vegetais.

Por outro lado, nenhum dos insetos provenientes de plantas não inoculadas apresentou amplificação compatível com o fungo (IP 1, 2 e 3). A ausência de amplificação nos controles negativos (NC), associada à correspondência com o controle positivo (PC), valida a especificidade das reações de PCR e sustenta o papel das plantas como possível fonte primária do fungo nos bioensaios subsequentes com *E. heros*.

4. Discussão

O presente estudo fornece evidências inéditas de que *Beauveria amorpha* é capaz de estabelecer colonização endofítica em plantas de soja e que essa colonização está associada ao aumento expressivo da mortalidade de *Euschistus heros* alimentados nesses tecidos vegetais. A colonização do fungo foi confirmada por meio de análises moleculares e pelo reisolamento a partir de tecidos vegetais, demonstrando sua associação aos tecidos internos da planta. Embora fungos entomopatogênicos sejam tradicionalmente utilizados por meio de aplicações sobre os insetos e, quando atuam como endófitos, sejam frequentemente relacionados à indução de efeitos subletais, alterações comportamentais ou respostas fisiológicas em herbívoros (Aravinthraju et al., 2024; Gange et al., 2019; González-Mas et al., 2021; Mannino et al., 2019), os resultados obtidos neste estudo ampliam significativamente esse entendimento. Em contraste com a maioria dos trabalhos envolvendo insetos sugadores, observou-se elevada mortalidade associada à exposição de *E. heros* a plantas colonizadas por *B. amorpha*, acompanhada da detecção molecular do fungo nos insetos provenientes dessas plantas.

A maioria das evidências sobre efeitos letais e subletais de fungos entomopatogênicos endofíticos via alimentação concentra-se em insetos mastigadores (Agbessenou et al., 2020; Altaf et al., 2023; Liu et al., 2025; Ramos et al., 2020). Nos quais a ingestão de tecidos vegetais colonizados aumenta a exposição do trato digestivo a metabólitos fúngicos e estruturas infectivas (Mannino et al., 2019). Nesses insetos, os efeitos observados são frequentemente atribuídos à indução de defesas da planta ou à ação direta de

compostos produzidos pelo fungo, embora a confirmação de infecção sistêmica no hospedeiro seja relativamente rara (Aravinthraju et al., 2024; Vega, 2018). Evidências provenientes de estudos não endofíticos ajudam a compreender esse padrão, indicando que a ingestão de conídios pode provocar alterações fisiológicas importantes em insetos mastigadores. Em *Sitophilus granarius*, por exemplo, estruturas fúngicas foram observadas no trato digestivo após ingestão de conídios, enquanto em *Tribolium castaneum* foi demonstrado que *Beauveria bassiana* pode comprometer a homeostase intestinal mesmo sem evidências de infecção sistêmica estabelecida (Batta, 2018; Preisegger et al., 2025). Entretanto, mesmo em lepidópteros como *Spodoptera frugiperda, Helicoverpa armigera, Mythimna separata* e *Plutella xylostella*, a mortalidade associada à alimentação em plantas colonizadas por fungos entomopatogênicos geralmente permanece inferior à observada em infecções decorrentes da penetração cuticular. Além disso, a confirmação da presença do fungo nesses insetos após a alimentação frequentemente se restringe à observação visual de estruturas fúngicas, sem confirmação molecular ou demonstração da persistência do microrganismo no hospedeiro (Herlinda et al., 2021; L. Liu et al., 2025).

Para insetos sugadores da ordem Hemiptera, os estudos envolvendo fungos entomopatogênicos endofíticos permanecem ainda mais limitados, sendo predominantemente associados a efeitos subletais, como alterações comportamentais, redução da alimentação ou diminuição da fecundidade (González-Mas et al., 2019). Mesmo nos casos em que são observados efeitos sobre a sobrevivência dos insetos, a aquisição do fungo a partir dos tecidos vegetais e sua presença no hospedeiro raramente são investigadas ou confirmadas. Como exemplo, *B. bassiana* endofítica promoveu aumento da mortalidade e efeitos de repelência em *Lygus lineolaris* alimentado em plantas colonizadas, porém sem confirmação da presença do fungo nos insetos avaliados (George et al., 2024) De forma semelhante, a colonização endofítica de *B. bassiana* em plantas de tabaco reduziu significativamente a sobrevivência e a fecundidade de *Myzus persicae*, embora não tenham sido apresentadas evidências diretas de aquisição do fungo durante a alimentação (Fingu-Mabola et al., 2021). Em contraste, os resultados obtidos neste estudo demonstram que a exposição de *Euschistus heros* a plantas colonizadas por *B. amorpha* resultou

em elevada mortalidade, acompanhada da detecção molecular do fungo exclusivamente nos insetos provenientes das plantas inoculadas. Associados à confirmação da colonização endofítica nas plantas, esses resultados fornecem fortes evidências de transferência planta–inseto mediada pela alimentação.

Os padrões de mortalidade diferiram drasticamente entre os tratamentos. Enquanto percevejos alimentados com plantas não inoculadas com *B. amorpha* apresentaram mortalidade inferior a 30%, elevada longevidade e reprodução normal após os sete dias de avaliação, os insetos expostos às plantas colonizadas exibiram redução acentuada da sobrevivência, com mortalidade de aproximadamente 70% durante o período de exposição e mortalidade total em até três dias após a retirada das plantas. Esse padrão sugere fortemente que os insetos alimentados em plantas colonizadas já se encontravam fisiologicamente comprometidos no momento da coleta, o que inviabilizou inclusive a construção da tabela de vida inicialmente proposta. Particularmente relevante é o fato de que a mortalidade continuou a progredir rapidamente mesmo após a interrupção completa do contato dos insetos com as plantas inoculadas. Considerando que os indivíduos remanescentes foram mantidos sob as mesmas condições experimentais dos controles, a mortalidade total observada nos dias subsequentes indica que o processo responsável pelo comprometimento da sobrevivência já havia sido desencadeado durante a fase de alimentação nas plantas colonizadas. Essa resposta reforça a estreita associação entre a exposição aos tecidos vegetais contendo *B. amorpha* e a mortalidade observada, constituindo uma importante evidência indireta de que a interação planta–fungo exerceu papel central no processo. Uma explicação plausível é que a exposição contínua a estruturas fúngicas, metabólitos produzidos por *B. amorpha* ou outros fatores associados à colonização endofítica tenha provocado alterações fisiológicas progressivas no hospedeiro. Estudos anteriores demonstram que a ingestão de fungos entomopatogênicos pode afetar a integridade e o funcionamento do trato digestivo, comprometendo processos relacionados à alimentação, digestão e absorção de nutrientes, além de provocar desequilíbrios fisiológicos que reduzem a aptidão do inseto e podem culminar em sua morte (Batta, 2018; Mannino et al., 2019; Preisegger et al., 2025).

Adicionalmente, a mortalidade observada pode estar relacionada a características fisiológicas do sistema digestivo de *E. heros*, especialmente à presença da câmara-filtro, estrutura típica de Hemiptera sugadores responsáveis pela rápida remoção de água e concentração de solutos durante a alimentação (Goodchild, 1966). Esse mecanismo pode potencializar a exposição do inseto a metabólitos fúngicos solúveis presentes nos tecidos vegetais colonizados, uma vez que diversos compostos produzidos por fungos entomopatogênicos são capazes de provocar alterações fisiológicas quando ingeridos continuamente (Goodchild, 1966; Vega et al., 2009).Além disso, a retenção diferencial de partículas ao longo do trato digestivo pode favorecer o contato prolongado entre estruturas fúngicas ingeridas e o epitélio intestinal (Rosell et al., 2003). Embora a câmara-filtro esteja associada ao intestino médio de origem endodérmica, regiões ectodérmicas do trato digestivo, como o estomodeu e o proctodeu, apresentam revestimento cuticular rico em quitina, o que potencialmente oferece substratos adequados para a adesão de propágulos fúngicos, considerando a reconhecida afinidade de fungos entomopatogênicos por superfícies quitinizadas ((Goodchild, 1966; Vega, 2018). Embora os mecanismos exatos envolvidos na mortalidade observada não tenham sido diretamente avaliados neste estudo, essas características fisiológicas fornecem uma explicação biologicamente plausível para os efeitos observados em *E. heros*, especialmente quando consideradas em conjunto com a elevada mortalidade registrada, a detecção molecular de *B. amorpha* nos insetos provenientes das plantas inoculadas e a continuidade da mortalidade mesmo após a interrupção do contato com as plantas colonizadas.

Outro aspecto relevante foi o intervalo de sete dias entre a inoculação das plantas e a introdução dos insetos. Esse período foi adotado para favorecer o estabelecimento endofítico de *B. amorpha* nos tecidos vegetais e foi baseado em protocolos empregados em estudos envolvendo fungos entomopatogênicos endofíticos, nos quais intervalos semelhantes são utilizados para permitir a colonização da planta antes da avaliação dos efeitos sobre herbívoros(Greenfield et al., 2016; Russo et al., 2015a, 2015b). De forma semelhante, diversos estudos que investigaram os efeitos de fungos entomopatogênicos endofíticos sobre insetos-praga realizaram a exposição dos

herbívoros apenas após um período destinado ao estabelecimento da colonização vegetal, incluindo trabalhos conduzidos com *Aphis gossypii*, *Spodoptera littoralis*, *Bemisia tabaci* e *Lygus lineolaris* (George et al., 2024; Gurulingappa et al., 2010b; Sánchez-Rodríguez et al., 2018; Wei et al., 2020b). No presente estudo, a colonização de *B. amorpha* foi confirmada por meio de análises moleculares e pelo reisolamento do fungo a partir de tecidos vegetais superficialmente desinfestados, evidenciando sua presença nos tecidos internos da planta. Adicionalmente, estudos demonstram que conídios de fungos entomopatogênicos apresentam redução progressiva da viabilidade quando expostos à radiação ultravioleta, à radiação solar e a temperaturas elevadas(Inglis; Johnson; Goettel, 1995; Kaiser et al., 2019; Oliveira et al., 2016). Considerando que o experimento foi conduzido durante o mês de novembro em Jaboticabal-SP, período caracterizado por temperaturas elevadas e intensa incidência de radiação solar e em uma casa de vegetação sem controle de temperatura, e que os insetos foram introduzidos apenas sete dias após a inoculação, as condições ambientais durante esse intervalo foram desfavoráveis à manutenção da viabilidade de conídios expostos na superfície foliar. Nesse contexto, a confirmação da colonização endofítica por métodos independentes, associada à detecção exclusiva de *B. amorpha* nas plantas inoculadas e nos insetos provenientes dessas plantas, reforça a interpretação de que os tecidos vegetais colonizados constituíram a principal fonte de exposição dos percevejos ao fungo e sustentam a ocorrência de um processo de transferência planta–inseto associado à alimentação em tecidos colonizados.

Do ponto de vista biológico, os resultados ampliam o entendimento das interações tritróficas entre plantas, fungos entomopatogênicos e insetos sugadores. Fungos endofíticos são tradicionalmente associados à modulação indireta das defesas vegetais, seja por alterações no perfil de metabólitos secundários ou pela indução de respostas sistêmicas da planta (Aravinthraju et al., 2024; Bhunjun et al., 2024; Liao et al., 2025). Em insetos sugadores, os efeitos reportados para fungos entomopatogênicos endofíticos têm sido predominantemente associados a alterações comportamentais, redução da fecundidade ou outros efeitos subletais (González-Mas et al., 2019). Isso ocorre porque a via alimentar tem sido historicamente considerada uma rota pouco

eficiente para a ação desses microrganismos nesse grupo de insetos (Gange et al., 2019). Os resultados obtidos neste estudo demonstram que *B. amorpha* endofítica foi capaz de comprometer significativamente a sobrevivência de *Euschistus heros*, uma espécie altamente móvel e de difícil controle. Até onde sabemos, este é o primeiro relato associando mortalidade em um percevejo sugador à aquisição de *Beauveria* a partir de tecidos vegetais colonizados endofiticamente, sustentado por evidências simultâneas de colonização vegetal, detecção molecular do fungo nos insetos expostos e elevada mortalidade após a alimentação.

Outro avanço relevante diz respeito à espécie fúngica investigada. A maior parte dos estudos envolvendo fungos entomopatogênicos endofíticos concentra-se em *bassiana(González-Mas et al., 2021; Wei et al., 2020a, 2020b)*, González-Mas et al., 2021; Wei et al., 2020a, 2020b), enquanto *B. amorpha* permanece pouco explorada sob a perspectiva ecológica e aplicada (Aravinthraju et al., 2024) Os resultados aqui obtidos demonstram, pela primeira vez, o potencial de *B. amorpha* para atuar como endófito funcional em plantas de soja e participar de um processo de transferência planta–inseto associado à mortalidade de um inseto-praga de elevada importância econômica, ampliando o espectro funcional atualmente conhecido para espécies do gênero *Beauveria*. A correta delimitação taxonômica do isolado foi fundamental para a interpretação ecológica desses resultados. Com base na análise filogenética utilizando genes concatenados, foi possível confirmar o enquadramento do isolado como *Beauveria amorpha*. A utilização de múltiplos marcadores moleculares, incluindo genes conservados além da região ITS, proporcionou maior robustez à identificação taxonômica, conforme recomendado para espécies do gênero *Beauveria* (Manfrino et al., 2024; Wang et al., 2022).Tal abordagem é particularmente importante diante das limitações associadas ao uso de loci únicos e da existência de sequências incorretamente identificadas em bancos de dados públicos, fatores que podem comprometer interpretações ecológicas e aplicações futuras envolvendo esses microrganismos.

Do ponto de vista aplicado, os resultados são particularmente relevantes para o manejo de *E. heros*, uma praga notoriamente difícil de controlar e com

histórico crescente de redução de suscetibilidade a inseticidas químicos ((Bueno et al., 2013; de F. Bueno et al., 2024; Guedes, 2017; Tuelher et al., 2018). A elevada mortalidade observada após a alimentação em plantas colonizadas por *B. amorpha* evidencia o potencial dessa interação para contribuir com estratégias sustentáveis de manejo, alinhadas aos princípios do manejo integrado de pragas. Além da possibilidade de reduzir a dependência exclusiva de inseticidas químicos, abordagens baseadas na colonização endofítica de plantas por fungos entomopatogênicos podem favorecer programas de manejo da resistência, reduzir o número de aplicações fitossanitárias e minimizar o uso de recursos associados às pulverizações convencionais. Em conjunto, os resultados demonstram que *B. amorpha* é capaz de colonizar sistemicamente plantas de soja e participar de um processo de transferência planta–inseto associado à mortalidade de *E. heros*. Dessa forma, este estudo reúne evidências inéditas envolvendo a espécie fúngica, o inseto-alvo e o mecanismo ecológico proposto, ampliando as perspectivas de utilização de fungos entomopatogênicos endofíticos no manejo de percevejos sugadores em sistemas de produção de soja.

Conclusão

Este estudo demonstra que *Beauveria amorpha* é capaz de colonizar endofiticamente plantas de soja e que essa colonização está associada à elevada mortalidade de *Euschistus heros* alimentados em tecidos vegetais colonizados. A colonização da planta foi confirmada por análises moleculares e pelo reisolamento do fungo, enquanto a detecção exclusiva de *B. amorpha* nos insetos provenientes das plantas inoculadas fornece evidências consistentes de um processo de transferência planta–inseto associado à alimentação. Em conjunto, os resultados ampliam o entendimento das interações entre plantas, fungos entomopatogênicos e insetos sugadores, fornecendo evidências inéditas para *B. amorpha* como endófito funcional em soja e para sua associação com a mortalidade de *E. heros*. Além de contribuir para o conhecimento ecológico dessas interações, os achados revelam o potencial de fungos entomopatogênicos endofíticos como ferramenta promissora para estratégias sustentáveis de manejo de percevejos na cultura da soja.

Referencias

Agbessenou A, Akutse KS, Yusuf AA, Ekesi S, Subramanian S, Khamis FM (2020) Endophytic fungi protect tomato and nightshade plants against *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) through a hidden friendship and cryptic battle. **Scientific Reports** 10:22185.

Altaf N, Ullah MI, Afzal M, Arshad M, Ali S, Rizwan M, Al-Shuraym LA, Alhelaify SS, Sayed S (2023) Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in maize plants affects the fitness of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Microorganisms** 11:1067.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology** 215:403-410.

Aravinthraju K, Shanthi M, Murugan M, Srinivasan R, Maxwell LA, Manikanda Boopathi N, Anandham R (2024) Endophytic entomopathogenic fungi: their role in enhancing plant resistance, managing insect pests, and synergy with management routines. **Journal of Fungi** 10:865.

Batta YA (2018) Efficacy of two species of entomopathogenic fungi against the stored-grain pest, *Sitophilus granarius* L. (Curculionidae: Coleoptera), via oral ingestion. **Egyptian Journal of Biological Pest Control** 28:74.

Bhunjun CS, Phukhamsakda C, Hyde KD, McKenzie EHC, Saxena RK, Li Q (2024) Do all fungi have ancestors with endophytic lifestyles? **Fungal Diversity** 125:73-98.

Bueno AF, Paula-Moraes SV, Gazzoni DL, Pomari AF (2013) Economic thresholds in soybean-integrated pest management: old concepts, current adoption, and adequacy. **Neotropical Entomology** 42:439-447.

Campos RA, Arruda W, Boldo JT, Da Silva MV, De Barros NM, De Azevedo JL (2005) *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria*

bassiana: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. **Current Microbiology** 50:257-261.

Cavalcante Silva C, Laumann RA, Blassioli MC, Pareja M, Borges M (2008) *Euschistus heros* mass rearing technique for the multiplication of *Telenomus podisi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 43:575-580.

Cheong PCH, Glare TR, Rostás M, Haines S, Brookes JJ, Ford S (2020) Lack of involvement of chitinase in direct toxicity of *Beauveria bassiana* cultures to the aphid *Myzus persicae*. **Journal of Invertebrate Pathology** 169:107281.

Clifton EH, Castrillo LA, Jaronski ST, Hajek AE (2023) Cryptic diversity and virulence of *Beauveria bassiana* recovered from *Lycorma delicatula* (spotted lanternfly) in eastern Pennsylvania. **Frontiers in Insect Science** 3:1158324.

Dalla Nora D, Piovesan BC, Bellé C, Stacke RS, Balardin RR, Guedes JVC, Cargnelutti Filho A (2021) Isolation and evaluation of entomopathogenic fungi against the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) under laboratory conditions. **Biocontrol Science and Technology** 31:22-34.

De F Bueno A, Sutil WP, Roswadoski L, Colmenarez YC (2024) Augmentative biological control of stink bugs on soybean: the Brazilian scenario. **CABI Agriculture and Bioscience** 5:63.

De Souza DA, Lopes RB, Humber RA, Faria M (2020) Assessment of the diversity of Brazilian entomopathogenic fungi in the genus *Beauveria*. **Journal of Invertebrate Pathology** 171:107347.

Dively GP, Patton T, Barranco L, Kulhanek K (2020) Comparative efficacy of common active ingredients in organic insecticides against difficult to control insect pests. **Insects** 11:1-31.

Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research** 32:1792-1797.

Ewing B, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research** 8:175-185.

Fingu-Mabola JC, Bawin T, Francis F (2021) Direct and indirect effect via endophytism of entomopathogenic fungi on the fitness of *Myzus persicae* and its ability to spread PLRV on tobacco. **Insects** 12:613.

Gange AC, Koricheva J, Currie AF, Jaber LR, Vidal S (2019) Meta-analysis of the role of entomopathogenic and unspecialized fungal endophytes as plant bodyguards. **New Phytologist** 223:2002-2010.

Geedi R, Canas L, Reding ME, Ranger CM (2023) Attraction of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) to volatiles emitted from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Environmental Entomology** 52:31-38.

George J, Glover JP, Perera OP, Reddy GVP (2024) Role of endophytic entomopathogenic fungi in mediating host selection, biology, behavior, and management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). **Plants**13:2123.

González-Mas N, Gutiérrez-Sánchez F, Sánchez-Ortiz A, Grandi L, Turlings TCJ, Muñoz-Redondo JM, Quesada-Moraga E (2021) Endophytic colonization by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* affects plant volatile emissions in the presence or absence of chewing and sap-sucking insects. **Frontiers in Plant Science** 12:660096.

González-Mas N, Sánchez-Ortiz A, Valverde-García P, Quesada-Moraga E (2019) Effects of endophytic entomopathogenic ascomycetes on the life-history traits of *Aphis gossypii* Glover and its interactions with melon plants. **Insects** 10:165.

Goodchild AJP (1966) Evolution of the alimentary canal in Hemiptera. **Biological Reviews** 41:97-140.

Gordon D, Abajian C, Green P (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research** 8:195-202.

Green P (1996) PHRAP documentation. Seattle: University of Washington.

Greenfield, M.; Gómez-Jiménez, M. I.; Ortiz, V.; Vega, F. E.; Kramer, M.; Phelps, R. H. (2016). Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. **Biological Control,** 95: 40–48.

Guedes RNC (2017) Insecticide resistance, control failure likelihood and the First Law of Geography. **Pest Management Science** 73:479-484.

Gurulingappa, P.; Sword, G. A.; Murdoch, G.; Mcgee, P. A. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. **Biological Control** 55:34-41, 2010.

Herlinda S, Gustianingtyas M, Suwandi S, Suharjo R, Sari JMP, Lestari RP (2021) Endophytic fungi confirmed as entomopathogens of the new invasive pest, the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), infesting maize in South Sumatra, Indonesia. **Egyptian Journal of Biological Pest Control** 31:150.

Hu S, Bidochka MJ (2021) Root colonization by endophytic insect-pathogenic fungi. **Journal of Applied Microbiology**130:570-581.

Huson DH, Scornavacca C (2012) Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. **Systematic Biology** 61:1061-1067.

Hyde KD, Chomnunti P, Crous PW, Groenewald JZ, Damm U, Ko TWK, Shivas RG, Summerell BA, Tan YP (2010) A case for re-inventory of Australia's plant pathogens. **Persoonia** 25:50-60.

Inglis, G. D.; Johnson, D. L.; Goettel, M. S. (1995). Effects of simulated solar radiation on the viability of conidia of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride*. **Biological Control,** 5: 581–590.

Instituto Agronômico de Campinas (2022) Banco ativo de germoplasma. Campinas: IAC.

Jallow, M. F. A.; Dugassa-Gobena, D.; Vidal, S. (2010). Indirect interaction between an unspecialized endophytic fungus and a polyphagous moth. **Basic and Applied Ecology**, 11: 450–456.

Kaplan EL, Meier P (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of the American Statistical Association** 53:457-481.

Kuramae-Izioka EH (1997) A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista de Microbiologia** 28.

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS (2015) Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology** 132:1-41.

Landa BB, López-Díaz C, Jiménez-Fernández D, Montes-Borrego M, Muñoz-Ledesma FJ, Ortiz-Urquiza A, Quesada-Moraga E (2013) In-planta detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new-developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. **Journal of Invertebrate Pathology** 114:128-138.

Liao C, Doilom M, Jeewon R, Hyde KD, Manawasinghe IS, Chethana KWT, Phukhamsakda C, Pem D, Tibpromma S (2025) Challenges and update on fungal endophytes: classification, definition, diversity, ecology, evolution and functions. **Fungal Diversity** 131:301-367.

Liu L, Liu S, Meng Q, Chen B, Zhang J, Zhang X, Wang Y, Li H (2025) Evaluating *Beauveria bassiana* strains for insect pest control and endophytic colonization in wheat. **Insects** 16:183.

Lugtenberg BJJ, Caradus JR, Johnson LJ (2016) Fungal endophytes for sustainable crop production. **FEMS Microbiology Ecology** 92:fiw194.

Manfrino R, Gutierrez A, Ben Gharsa H, Schuster C, López Lastra C, Leclerque A (2024) Molecular taxonomic characterization and infra-specific diversity of

entomopathogenic *Beauveria bassiana* fungi from Argentina. **Fungal Biology** 128:1800-1805.

Mannino MC, Huarte-Bonnet C, Davyt-Colo B, Pedrini N (2019) Is the insect cuticle the only entry gate for fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi. **Journal of Fungi** 5:33.

Mantzoukas S, Eliopoulos PA (2020) Endophytic entomopathogenic fungi: a valuable biological control tool against plant pests. **Applied Sciences** 10:360.

Marassatto CM, Ferreira LP, Couceiro JDC, De Oliveira MR, Guidolin AS, Delalibera I Jr (2025) *Beauveria bassiana* triggers soybean systemic resistance and causes sublethal effects in *Spodoptera frugiperda*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 174:236-250

Mwamburi LA (2021) Endophytic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, confer control of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), in two tomato varieties. **Egyptian Journal of Biological Pest Control** 31:146.

Ortiz-Urquiza A, Riveiro-Miranda L, Santiago-Alvarez C, Quesada-Moraga E (2010) Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology** 105:270-278.

Posada D, Buckley TR (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic Biology** 53:793-808.

Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics** 14:817-818.

Preisegger L, Flecha JC, Ghilini F, Espin-Sánchez D, Prieto E, Oberti H, Susevich ML, Rojas MG (2025) Visualizing oral infection dynamics of *Beauveria bassiana* in the gut of *Tribolium castaneum*. **Journal of Fungi** 11:118.

Quesada-Moraga, E.; Muñoz-Ledesma, J.; Santiago-Álvarez, C. (2018). Systemic protection of Papaver somniferum against *Iraella luteipes* by an

endophytic strain of *Beauveria bassiana*. **Environmental and Experimental *Botany*,** 155: 58–65.

R Core Team (2024) R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

Ramos Y, Taibo AD, Jiménez JA, Portal O (2020) Endophytic establishment of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in maize plants and its effect against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Egyptian Journal of Biological Pest Control** 30:98.

Rehner SA, Buckley E (2005) A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia** 97:84-98.

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**19:1572-1574.

Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology** 61:539-542.

Rosell RC, Davidson EW, Jancovich JK, Hendrix DL, Brown JK (2003) Size limitations in the filter chamber and digestive tract of nymphal and adult *Bemisia tabaci* whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae). **Annals of the Entomological Society of America** 96:544-551.

Russo ML, Pelizza SA, Vianna MF, Allegrucci N, Cabello MN, Toledo AV, Scorsetti AC (2019) Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) Merr. growth and yield. **Journal of King Saud University - Science** 31:728-736.

Russo, M. L.; Pelizza, S. A.; Cabrera Walsh, G.; Scorsetti, A. C. (2015). Endophytic colonization of tomato plants by *Beauveria bassiana* and its effects on *Spodoptera frugiperda*. **BioControl,** 60: 313–322.

Sambrook J, Russell DW (Eds.) (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez-Rodríguez, A. R.; Raya-Díaz, S.; Zamarreño, Á. M.; García-Mina, J. M.; Del Campillo, M. C.; Quesada-Moraga, E. An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae. **Biological Control,** v. 116, p. 90–102, 2018.

Sinno M, Ranesi M, Di Lelio I, Iacomino G, Becchimanzi A, Barra E, Molisso D, Pennacchio F, Digilio MC, Vitale S (2021) Selection of endophytic *Beauveria bassiana* as a dual biocontrol agent of tomato pathogens and pests. **Pathogens**10:1242.

Stiller JW, Hall BD (1997) The origin of red algae: implications for plastid evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 94:4520-4525.

Therneau TM (2023) Survival: a package for survival analysis in R. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

Tuelher ES, Da Silva EH, Rodrigues HS, Hirose E, Guedes RNC, Oliveira EE (2018) Area-wide spatial survey of the likelihood of insecticide control failure in the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. **Journal of Pest Science** 91:849-859.

Vega FE (2018) The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. **Mycologia** 110:4-30.

Vega FE, Goettel MS, Blackwell M, Chandler D, Jackson MA, Keller S, Koike M, Maniania NK, Monzón A, Ownley BH, Pell JK, Rangel DEN, Roy HE (2009) Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**2:149-159.

Vega FE, Posada F, Aime MC, Pava-Ripoll M, Infante F, Rehner SA (2008) Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control** 46:72-82.

Wang Y, Fan Q, Wang D, Zou WQ, Tang DX, Hongthong P, Chen M, Zhou Z, Xu J, Wang S (2022) Species diversity and virulence potential of the *Beauveria bassiana* complex and *Beauveria scarabaeidicola* complex. **Frontiers in Microbiology** 13:838673.

Wei QY, Li YY, Xu C, Wu YX, Zhang YR, Liu H (2020) Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* increases the resistance of tomatoes against *Bemisia tabaci*. **Arthropod-Plant Interactions** 14:289-300.

Wei QY, Li YY, Xu C, Wu YX, Zhang YR, Liu H (2020) Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* increases the resistance of tomatoes against *Bemisia tabaci*. **Arthropod-Plant Interactions** 14:289-300.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.) PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, p. 315-322.

Zimmermann G (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology** 17:553-596.

CAPÍTULO 3- EFEITOS MULTIDIMENSIONAIS DE *Beauveria amorpha* ENDOFÍTICA EM SOJA: PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, FITORMÔNIOS, PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E TOLERÂNCIA À HERBIVORIA DE *Euschitus heros*

IMAGEM RESUMO:



RESUMO: A soja é uma das principais culturas mundiais e constitui um modelo agronômico relevante para o estudo de respostas fisiológicas e metabólicas a estresses bióticos, como a herbivoria por insetos sugadores, incluindo *Euschistus heros*. Fungos entomopatogênicos endofíticos do gênero *Beauveria* têm emergido como componentes promissores em sistemas agrícolas sustentáveis. Neste estudo, avaliou-se o potencial endofítico de *Beauveria amorpha* na modulação das respostas fisiológicas, hormonais e de crescimento da soja sob herbivoria de *E. heros*. Inicialmente, o isolado de *B. amorpha* foi caracterizado quanto às suas capacidades de promoção de crescimento vegetal. Posteriormente, plantas de soja foram inoculadas com *B. amorpha* (1×10^7 conídios mL^{-1}) por tratamento de sementes e aplicação foliar e, após sete dias, submetidas ou não à infestação com *E. heros* em casa de vegetação. Nas plantas, foram realizadas análises de trocas gasosas (IRGA), parâmetros hormonais, atributos morfométricos e confirmação da colonização endofítica. A colonização fúngica foi confirmada exclusivamente em plantas inoculadas. Plantas associadas a *B. amorpha* mantiveram maior estabilidade das trocas gasosas após a herbivoria, com taxas elevadas de assimilação de CO_2, condutância estomática e transpiração, além de maior acúmulo de biomassa aérea, maior altura da parte aérea e estabilidade dos teores de clorofila. A análise hormonal revelou uma reorganização do balanço hormonal,

caracterizada por redução de auxina, ácido abscísico, ácido jasmônico e ácido salicílico, associada a ajustes finos na sinalização por citocininas. A análise de correlação e redes hormonais indicou preservação da arquitetura básica da sinalização, porém com menor conectividade entre hormônios em plantas inoculadas com *B. amorpha*, sugerindo menor custo metabólico das respostas ao estresse. Esses resultados reforçam o potencial de fungos entomopatogênicos endofíticos como ferramentas multifuncionais para o manejo sustentável de pragas, integrando promoção de crescimento, tolerância ao estresse biótico e eficiência fisiológica em sistemas agrícolas.

Palavras-chave: hormônio vegetal, fisiologia vegetai, tolerância vegetal, herbivoria, inseto-sugador, fungo entomopatogenico, proteção de plantas

1. Introdução

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das principais culturas agrícolas mundiais, com produção global estimada em mais de 420 milhões de toneladas na safra de 2025/2026, tendo papel central na segurança alimentar, na produção de proteína vegetal e animal, e no fornecimento de matérias-primas para os setores energético e industrial (Food and Agriculture Organization (FAO), 2025; Messina, 2022; United States Department of Agriculture – Foreign Agricultural Service, 2026; Vargas-Almendra et al., 2024). Os EUA, Brasil e Argentina são responsáveis por 80% da produção mundial, sendo o Brasil o maior produtor e exportador da cultura (United States Department of Agriculture – Foreign Agricultural Service, 2026). Devido a sua importância, a soja constitui um modelo agronômico relevante para o estudo de respostas fisiológicas e metabólicas a estresses bióticos que prejudicam drasticamente sua produção, como o ataque de insetos sugadores (C. Li et al., 2024; Timbó et al., 2014). Entre esses, o percevejo-marrom *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae), umas das principais pragas da soja na região Neotropical, provoca alterações profundas no metabolismo vegetal ao se alimentar diretamente da seiva, interferindo na assimilação de carbono, no balanço hídrico e no crescimento da planta(Bueno et al., 2013; de F. Bueno et al., 2024; Timbó et al., 2014; Villas Boas & Panizzi, 1980). Diferentemente de insetos mastigadores, os sugadores desencadeiam respostas fisiológicas mais sutis, porém prolongadas, frequentemente

associadas a ajustes hormonais complexos e a custos metabólicos elevados(H. Li et al., 2023; Walling, 2000; Zvereva et al., 2010).

A resposta das plantas à herbivoria desses insetos pragas é regulada por uma rede hormonal altamente integrada, na qual fitohormônios associados à defesa, como ácido jasmônico (JA), ácido salicílico (SA) e ácido abscísico (ABA), interagem de forma antagonista ou sinérgica com hormônios clássicos de crescimento, incluindo auxinas, giberelinas e citocininas (Pieterse et al., 2012; Y. Wang et al., 2021). Embora a ativação dessas vias seja essencial para a sobrevivência da planta sob ataque, sua indução frequentemente resulta em um trade-off fisiológico entre crescimento e defesa, caracterizado por redução da fotossíntese, fechamento estomático, limitação da expansão celular e redirecionamento de recursos metabólicos para processos defensivos (He et al., 2022; V. Verma et al., 2016; Zrimec et al., 2025).Nesse contexto, a capacidade da planta em modular finamente o balanço hormonal diante de estresses bióticos emerge como um fator determinante para a manutenção da homeostase fisiológica(Aerts et al., 2021).

Evidências recentes indicam que microrganismos associados às plantas, particularmente fungos endofíticos, desempenham papel central na modulação do balanço hormonal diante de estresses bióticos, influenciando tanto a sinalização hormonal quanto processos fisiológicos fundamentais, como trocas gasosas, eficiência do uso da água e crescimento vegetativo (Baron & Rigobelo, 2022; Poudel et al., 2021). Esses microrganismos podem atuar como reguladores metabólicos, ajustando a intensidade e a duração das respostas de defesa, ao mesmo tempo em que preservam funções essenciais relacionadas ao crescimento (Bastías et al., 2022; Lu et al., 2021). Entre os fungos associados às plantas, *Beauveria* spp. são tradicionalmente reconhecidas por sua atuação como entomopatogênicas (Cheong et al., 2020; Clifton et al., 2023; Ortiz-Urquiza et al., 2010; Zimmermann, 2007). No entanto, estudos recentes têm ampliado essa visão, demonstrando que algumas espécies são capazes de estabelecer colonização endofítica funcional em diferentes hospedeiros vegetais (Altaf et al., 2023; Russo et al., 2019; Wei et al., 2020b). Essa associação pode resultar em alterações profundas no metabolismo da planta, incluindo mudanças no perfil hormonal e na eficiência fisiológica, com consequências diretas para o

crescimento e a tolerância ao estresse biótico(Ahsan et al., 2024; Campos et al., 2005; Lu et al., 2021). Apesar desses avanços, os mecanismos fisiológicos e hormonais envolvidos na interação planta–*Beauveria*–inseto ainda permanecem pouco explorados, especialmente em culturas de grande relevância como a soja.

Dentro desse cenário, *Beauveria amorpha* destaca-se como uma espécie ainda pouco investigada sob a perspectiva hormonal e fisiológica vegetal. Embora historicamente agrupada dentro do complexo *Beauveria bassiana*, evidências moleculares recentes têm permitido sua delimitação taxonômica precisa, abrindo novas possibilidades para a compreensão de suas funções ecológicas (Aravinthraju et al., 2024; Campos et al., 2005; D. A. de Souza et al., 2020). Contudo, permanece desconhecida capacidade de se *B. amorpha* atuar como endófito funcional em soja e de que maneira essa associação influencia o balanço hormonal, a fisiologia fotossintética e o crescimento da planta, particularmente sob pressão de herbivoria por insetos sugadores. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo investigar, de forma integrada, os efeitos da colonização endofítica por *B. amorpha* sobre a fisiologia e o metabolismo hormonal de plantas de soja submetidas ou não à infestação por *E. heros*. Ao integrar esses diferentes níveis de organização biológica, este trabalho busca elucidar como a presença de um fungo endofítico entomopatogênico pode reprogramar o balanço hormonal da planta, atenuando os custos fisiológicos da herbivoria e redefinindo o trade-off entre crescimento e defesa.

2. Material e métodos

2.1. Criação de insetos

Os *Euschitus heros* utilizados neste estudo foram provenientes da criação mantida no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes-Praga (LCMAP), Universidade Estadual Paulista (UNESP/FCAV), Jaboticabal, SP, Brasil. A criação iniciou em maio de 2022 e reforçada por novas introduções em 2023 e 2024. Os insetos foram mantidos em caixas plásticas com tampa de

tecido voil, que permitia ventilação adequada e evitava a fuga. A dieta para alimentação foi composta por vagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e grãos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), complementada por chumaços de algodão embebidos em água deionizada. Papel toalha foi colocado no fundo da gaiola para absorver os excrementos dos insetos e tecidos de algodão cru foram dispostos nas laterais das gaiolas para oviposição. A manutenção da criação foi realizada duas vezes por semana. Os insetos foram mantidos sob condições controladas de temperatura (26 ± 1 °C), umidade relativa (70 ± 10%) e fotoperíodo (14h luz :10h escuro), conforme metodologia descrita por (Cavalcante Silva et al., 2008).

2.2. Isolado fúngico utilizado

O fungo *Beauveria* utilizado neste experimento foi selecionado de um projeto de prospecção para o controle de *E. heros* e inicialmente identificado como *Beauveria bassiana,* isolado UFM01, depositado na coleção de microrganismo da Universidade Federal de Santa Maria, SC, Brasil (Dalla Nora et al., 2021). No entanto, ele foi submetido à uma nova identificação molecular e reclassificado como *Beauveria amorpha* (processo de publicação no NCBI (GenBank)). A cepa foi reativada em *E. heros* e replicada em meio batata-dextrose-ágar (BDA) suplementado com pentabiótico. As placas com o fungo foram mantidas em câmara climatizada (B.O.D.) a 26 °C por 10 dias, até a completa esporulação. Em seguida, discos de micélio (4 mm de diâmetro) foram transferidos para criotubos contendo 1 mL de glicerol a 10% e armazenados a –80 °C. Sempre que necessário, o isolado foi reativado em BDA para uso experimental.

2.3. Atividades de promoção do crescimento de do isolado fúngico de *Beauveria amorpha*

Antes dos experimentos de inoculação em plantas de soja, o isolado fúngico de *Beauveria amorpha* foi avaliado quanto ao seu potencial de produção

de compostos que podem induzir o crescimento vegetal. Para isso, foram analisadas a capacidade de solubilização de fosfato, a produção e quantificação de ácido indolacético (AIA), a produção de sideróforos e a atividade da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACC deaminase).

2.3.1. Avaliação qualitativa da solubilização de fosfato

A capacidade de solubilização de fosfato pelo fungo *Beauveria amorpha* foi avaliada em meio sólido, conforme descrito por (Goldstein, 1986; S. C. Verma et al., 2001) com base na formulação proposta por (Goldstein, 1986) com adaptações. O meio de cultura continha (g L^{-1}): glicose, 10.0; NH_4Cl, 5.0; NaCl, 1.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0; $Ca_3(PO_4)_2$, 0.8; e ágar, 15.0. O pH foi ajustado para 7.2 antes da esterilização, utilizando KOH ou H_2SO_4 conforme necessário. Após o preparo, o meio foi vertido em placas de Petri estéreis. Foram preparadas dez placas, sendo cinco suplementadas com pentabiótico (0,5 g L^{-1}) e cinco sem o antibiótico, para evitar erro metodológico. No centro de cada placa foi depositado um disco sólido (raio de 4 mm) de meio de cultura contendo conídios de *B. amorpha*. As placas foram incubadas a 26 ± 1 °C e 80 ± 5 % de umidade relativa, e observadas periodicamente durante sete dias. A atividade de solubilização de fosfato foi avaliada qualitativamente pela formação de halos claros ao redor das colônias, indicativos da solubilização do fosfato de cálcio presente no meio.

2.3.2. Quantificação da solubilização de fosfato por *Beauveria amorpha*

A quantificação do fósforo solubilizado por *Beauveria amorpha* foi realizada conforme metodologia descrita por Nahas (1996) com adaptações. O meio de cultura utilizado para o ensaio continha (g L^{-1}): NaCl, 0,1; NH_4Cl, 1,0; KCl, 0,2; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,2; glicose, 10,0; extrato de levedura, 0,5; e $Ca_3(PO_4)_2$, 5,0, dissolvidos em 1000 mL de água destilada, com pH ajustado para 7,0 antes da esterilização. Para o ensaio, 25 mL do meio foram

distribuídos em erlenmeyers de 125 mL, os quais foram inoculados com um disco de *B. amorpha* cada (raio de 4 mm). As culturas foram incubadas a 28 °C sob agitação constante de 120 rpm durante 48 horas. Após o período de incubação, 5 mL da cultura foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos, e 1 mL do sobrenadante foi utilizado para a determinação do fósforo solubilizado. A quantificação foi realizada pela adição de 4 mL de água destilada e 2 mL da solução de molibdato-vanadato ao sobrenadante. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 420 nm. A concentração de fósforo solubilizado foi determinada com base em curva padrão obtida a partir de soluções com concentrações conhecidas de fósforo. Como controle (branco), foi utilizado o meio de cultura sem inoculação, submetido ao mesmo procedimento descrito para as amostras.

2.3.3. Produção e quantificação de ácido indolacético (AIA)

A capacidade de produção de ácido indolacético (AIA) pelo fungo *Beauveria amorpha* foi avaliada em meio líquido contendo L-triptofano, conforme metodologia modificada de (Nahas, 1996; Pains et al., 2007). O meio de cultura foi composto por (g L^{-1}): glicose, 6.0; peptona, 1.5; extrato de levedura, 2.0; fosfato de potássio bibásico, 0.5; L-triptofano, 1.02 (5 mM); sulfato de magnésio heptahidratado, 0.5; e ácido glutâmico, 1.5, ajustando-se o pH para 6.0 antes da esterilização. Alíquotas de 25 mL do meio foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL e inoculadas com um disco de *B. amorpha* cada (raio de 4 mm). As culturas foram incubadas a 28 °C, sob agitação constante (120 rpm) durante 48 h. Após o período de incubação, 5 mL da cultura foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min, e o sobrenadante utilizado para quantificação do AIA. Para a determinação, 2 mL do sobrenadante foram misturados a 2 mL do reagente de Salkowski (solução de $FeCl_3$ em ácido perclórico), e as amostras foram mantidas por 30 min em temperatura ambiente e ausência de luz. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 530 nm. A quantificação foi feita com base em curva padrão de AIA preparada com concentrações conhecidas do hormônio.

2.3.4. Produção de sideráforos

A produção de sideróforos por *Beauveria amorpha* foi avaliada utilizando o meio Chrome Azurol S (CAS-agar), preparado de acordo com o protocolo modificado de (Ikram et al., 2023a; Neilands, 1987) com adaptações para análise qualitativa. Inicialmente, preparou-se o reagente CAS dissolvendo-se 60,5 mg de chrome azurol S em 50 mL de água destilada, seguido da adição de 10 mL de solução férrica (1 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ em 10 mM HCl). Sob agitação constante, essa solução foi adicionada lentamente à solução contendo 72,9 mg de HDTMA (hexadecyltrimetilamônio brometo) previamente dissolvida em 40 mL de água destilada. O conjunto foi autoclavado a 121 °C por 15 min.

O meio basal foi preparado com 0,5% de ácido succínico, 0,4% de fosfato dipotássico (K_2HPO_4), sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4 \cdot 7H_2O$) e 2% de ágar, ajustado para pH 5,3. Após autoclavagem, o reagente CAS parcialmente resfriado foi incorporado ao meio basal até obtenção de coloração azul homogênea, que então foi distribuído nas placas de Petri. Para o ensaio, um disco de micélio ativo de *B. amorpha* cada (raio de 4 mm) foi depositado no centro de cada placa (10 placas no total). As placas foram incubadas a 28 ± 2 °C por sete dias. A produção de sideróforos foi avaliada qualitativamente, registrando-se a alteração de coloração no meio CAS ao redor do ponto de inoculação. A mudança da coloração azul para tons de laranja ou rosa foi considerada indicativa de produção de sideróforos

2.3.5. Avaliação da atividade da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACC deaminase)

A atividade da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACC deaminase) foi avaliada conforme metodologia descrita por (De et al., n.d.; Ikram et al., 2023b; Penrose & Glick, 2003) com adaptações. O isolado fúngico *Beauveria amorpha* foi cultivado em meio mineral líquido Dworkin e Foster (DF), suplementado com 3,0 mM de 1-aminociclopropano-1-carboxílico

(ACC) como única fonte de nitrogênio. O cultivo foi incubado a 30 °C, sob agitação constante (200 rpm), por 48 h para indução da produção enzimática. Após o período de incubação, o meio foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 min, e o sobrenadante foi coletado para a determinação da atividade enzimática. A reação foi realizada em tubos contendo 200 µL do sobrenadante e 300 µL de solução de ACC (30 mM), incubados a 30 °C por 30 min. Em seguida, adicionaram-se 1 mL da solução de ácido 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, 0,1%) e os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de NaOH (2 N), e a absorbância foi lida em 540 nm em espectrofotômetro. A concentração de α-cetobutirato produzida foi determinada com base em uma curva padrão de α-cetobutirato (Sigma-Aldrich, EUA), variando de 0,1 a 1,0 µM. A atividade da ACC deaminase foi expressa como a quantidade de α-cetobutirato (µmol) produzida por miligrama de proteína por hora. A quantificação foi feita com base em curva padrão de ACC deaminase preparada com concentrações conhecidas.

2.4. Implementação do experimento casa de vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Estadual de São Paulo UNESP/FCAV Campus de Jaboticabal, SP, Brasil, com sementes de soja não transgênica (*Glycine max* L. Merr.), cultivar BRS-544 RR, fornecidas pela Embrapa Soja (Londrina, PR, Brasil).

As sementes foram esterilizadas com etanol 70% por 1 min, e imersas em hipoclorito de sódio a 6% por 30 segundos e enxágue triplo com água destilada estéril. Após a limpeza, as sementes foram secas em papel filtro dentro de uma câmara de fluxo laminar. O delineamento experimental consistiu em quatro parcelas, cada uma com quatro repetições correspondentes aos tratamentos: (1) controle (sem fungo e sem inseto); (2) plantas inoculadas com *Beauveria amorpha*; (3) plantas infestadas com *Euschistus heros*; e (4) plantas inoculadas e posteriormente infestadas. Cada parcela consistiu de três plantas por tratamento. A média dessas três plantas foi utilizada como unidade experimental nas análises (n = 4 repetições por tratamento).

A inoculação fúngica foi realizada por meio de tratamento de sementes com uma suspensão de 1 × 10^7 conídios mL^{-1} (concentração definida em pré-testes), seguida de aplicação foliar na mesma concentração. As sementes foram submersas por duas horas na suspensão de conídios com 0,005% de Tween 80. Sementes do tratamento controle e planta com fungo e inseto foram imersas em água deionizada estéril contendo 0,005% de Tween 80. Após a imersão, as sementes foram semeadas em bandejas contendo substrato autoclavado (BIOMIX®), previamente esterilizado três vezes a 120 °C por 20 min, garantindo um ambiente asséptico e desenvolvimento uniforme das plântulas.

No estádio V1, as plântulas foram transplantadas para vasos de 5 L contendo mistura esterilizada de areia, esterco bovino e latossolo vermelho-escuro (1:1:2). A fertilidade desse solo utilizado foi analisada e corrigida conforme as recomendações do Boletim 100 do Instituto Agronômico de Campinas (Instituto Agronômico de Campinas, 2022). Quando a planta atingiu o estágio V3 (três trifólios totalmente expandidos) foi realizado a inoculação foliar de *B. amorpha* com o auxílio de um pincel macio com cerdas volumosas, aplicando a suspensão fúngica em toda superfície abaxial das folhas, usando a usando metodologia adaptada de Marassatto et al, (2025). As folhas do tratamento ‘controle’ e tratamento ‘planta com fungo e inseto’ foram pinceladas na parte abaxial da folha com água deionizada estéril contendo 0,005% de Tween 80.

Sete dias após a aplicação foliar de *Beauveria amorpha*, foi realizado o Bioensaio com *Euschitus heros* em plantas de soja. Para isso, 10 fêmeas e cinco machos recém-emergidos de *E. heros* foram transferidos para cada planta dos tratamentos 3 e 4 (plantas infestadas com *Euschistus heros* e plantas inoculadas e posteriormente infestadas). Todas as plantas dos quatros tratamentos foram isoladas em gaiolas metálicas (80cm × 100 cm) revestidas com tecido voil, permitindo ventilação adequada e evitando a fuga dos insetos e a proteção das plantas. Os insetos permaneceram nas plantas por sete dias. Ao término do período de exposição as plantas foram utilizadas para as análises de confirmação de inoculação, de atributos de crescimento da planta e hormonais.

2.5. Análises de confirmação de inoculação de *Beauveria amorpha* em tecidos das plantas de sojas

Para confirmar a inoculação e a ausência de colonização fúngica, foi empregado o método destrutivo em plantas de soja dos quatro tratamentos. Foram utilizadas duas plantas por tratamento. De cada planta, uma folha de cada trifólio foi coletada e agrupada (pool) para a análise. As amostras foliares foram esterilizadas superficialmente em álcool 70% por 2 minutos, seguidas de imersão em hipoclorito de sódio a 6% por 1 minuto, e posteriormente enxaguadas três vezes com água destilada estéril. O procedimento seguiu o método descrito por (Russo et al., 2019), com adaptações. Em câmara de fluxo laminar, as folhas de cada tratamento foram cortadas com tesoura previamente esterilizada em fragmentos de aproximadamente 1 cm². Cinco fragmentos foliares foram depositados em placas de Petri contendo meio CTC (composto por extrato de levedura, batata, dextrose, ágar, cloranfenicol, cicloheximida e tetraciclina), com duas réplicas/placas por tratamento. As placas foram mantidas a 26 °C em câmara de crescimento tipo B.O.D. O crescimento fúngico foi avaliado entre 10 e 15 dias após a incubação.

As colônias emergentes foram examinadas microscopicamente para confirmação morfológica de *B. amorpha*. A colonização endofítica foi expressa como frequência de colonização (FC), calculada pela fórmula: FC = (número de pedaços de plantas colonizados / número total de pedaços de plantas examinados) × 100 (Petrini & Fisher, 1986).

2.6. Análises fisiológicas das plantas de soja

Os parâmetros fisiológicos foram avaliados em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) citadas no tópico ‘Implementação do experimento casa de vegetação’. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos, com quatro tratamentos: planta controle (C), planta com inseto (I), planta com fungo (F) e planta com fungo + inseto (FI), totalizando 16 plantas. A distribuição nos

blocos foi realizada da seguinte forma: Bloco 1: 1(C), 5(I), 9(F), 13(FI); Bloco 2: 2(C), 6(I), 10(F), 14(FI); Bloco 3: 3(C), 7(I), 11(F), 15(FI); e Bloco 4: 4(C), 8(I), 12(F), 16(FI).

As avaliações fisiológicas foram realizadas em dois momentos/estádios fenológicos distintos: A primeira avaliação (Dia 1) foi realizada imediatamente após essa remoção dos *E. heros* das plantas no estádio, quando a soja estava no estádio R1. A segunda avaliação (Dia 2) ocorreu 8 dias depois, já na fase de floração plena (início da emissão dos estiletes) no estádio R2/R3 da soja, e sem a presença de insetos desde a primeira medição. Assim, o Dia 1 representa o efeito fisiológico imediato da herbivoria sobre plantas com ou sem inoculação fúngica, enquanto o Dia 2 reflete a resposta fisiológica tardia, já na fase reprodutiva, após um período de recuperação sem pressão herbívora.

As medições foram efetuadas às 9h, na folha central do trifólio totalmente expandido, evitando-se a nervura central(Bacha et al., 2024). As avaliações fisiológicas foram verificadas por meio de trocas gasosas determinadas com o auxílio de um analisador de gás por infravermelho (IRGA, modelo LCpro-SD, ADC BioScientific®, Reino Unido). Foram mensurados os seguintes parâmetros: taxa fotossintética líquida (A, μmol CO_2 m^{-2} s^{-1}), taxa de transpiração (E, mmol H_2O m^{-2} s^{-1}), condutância estomática (gs, mol H_2O m^{-2} s^{-1}) e concentração intercelular de CO_2 (Ci, μmol mol^{-1}) e temperatura foliar (Leaf Temperature, °C), registrada diretamente pelo sensor térmico acoplado à câmara foliar do equipamento. As medições foram realizadas sob condições controladas de fluxo de ar (400 μmol s^{-1}), concentração de CO_2 (400 μmol mol^{-1}), densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo (PPFD) de 1100 μmol m^{-2} s^{-1} e pressão atmosférica aproximada de 1000 kPa. A partir desses dados, foram calculadas a eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci) e a eficiência no uso da água (WUE = A/E).

2.7. Análise dos atributos de crescimento das plantas de soja

As mesmas 16 plantas utilizadas nas análises fisiológicas, distribuídas nos quatro tratamentos (planta controle, planta com *Euschitus heros*, planta com *Beauveria amorpha* e planta com *E. heros e B. amorpha*), foram avaliadas quanto ao crescimento e desenvolvimento. As medições foram efetuadas no mesmo dia de avaliação das 'Análises fisiológicas', sendo também realizadas em dois períodos: início da floração R1 (quando os insetos foram retirados) e plena floração e início da formação das vagens R2/R3 (sem a presença de insetos desde a primeira medição). Foram mensurados a altura da parte aérea (até o último trifólio totalmente expandido), o diâmetro do caule (média de duas medidas opostas com paquímetro). Na mesma folha utilizada para as medições de trocas gasosas (análises fisiológicas), foi determinado o índice de clorofila total (SPAD) com auxílio de um clorofilômetro (ClorofiLog CFL 1030, Falker®, Brasil). Três leituras foram realizadas por folha, evitando-se a nervura central, e os valores médios foram expressos em unidades SPAD.

Uma avaliação adicional foi conduzida quando a planta estava no estágio R4. Foram mensurados a altura da parte aérea (até o último trifólio totalmente expandido) comprimento da raiz (da primeira raiz da planta até a de maior comprimento), massa seca da parte aérea e massa seca da raiz. Para mensurar massa seca, as amostras de parte aérea e raízes foram lavadas, acondicionadas em individualmente em sacos de papel e secas em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C até peso constante (aproximadamente 72 h).

2.8. Análises hormonais das plantas de soja

Em plantas sem insetos e após a segunda medição dos parâmetros fotossintéticos, um grupo de plantas foi destinado para a realização das análises hormonais. Nestas plantas, as amostras foram coletadas consistiu em um trifólio da parte média da planta de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), correspondente à terceira folha totalmente expandida de cima para baixo. Para cada tratamento, foi realizado um pool constituído por tecido foliar de três plantas individuais, representando uma réplica biológica. Foram obtidos três pools por tratamento, totalizando 12 réplicas biológicas (4 tratamentos × 3 réplicas). As amostras de

cada pool foram acondicionadas em envelopes de papel laminado com furos cilíndricos, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, seguidamente homogeneizadas em cadinhos de porcelana com nitrogênio líquido, liofilizadas e pesadas (aproximadamente 30 mg), sendo posteriormente enviadas para quantificação hormonal.

A extração dos hormônios foi conduzida conforme metodologia adaptada de (Bacha et al., 2024; Seo et al., 2011). Os tubos contendo o tecido vegetal foram adicionados 2,0 mL da solução extratora composta por 80% de metanol, 1% de ácido acético e 19% de água destilada. Em seguida, adicionaram-se os padrões internos marcados com deutério (OlChemim® Ltd, Olomouc, República Tcheca), em uma mistura de 80 µL contendo os seguintes hormônios deuterados: 10 ppb de giberelinas (d2-GA1 e d2-GA4) e citocininas (d3-DHZ, d6-iP e d5-tZ), e 1000 ppb de ácido abscísico (d6-ABA), ácido indolacético (d5-IAA) e ácido salicílico (d4-SA).

As amostras permaneceram sob agitação (Ika® VXR Basic Vibrax®) a 1000 vibrações min^{-1} por 60 min a 4 °C, sendo posteriormente centrifugadas (Eppendorf® mod. 5415R) a 10.000 g por 4 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos de 2 mL e mantido a −20 °C por 24 h para precipitação de proteínas. Após nova centrifugação (10.000 g, 4 min, 4 °C), o sobrenadante foi transferido para tubos de vidro de 5 mL e concentrado em evaporador a vácuo (Thermo Scientific® Savant SPD1010 SpeedVac Concentrator) por 3 h à temperatura ambiente.

Os extratos concentrados foram ressuspendidos em 1 mL de solução de 1% de ácido acético, homogeneizados em vórtex e purificados por cromatografia em colunas Oasis HLB® (fase reversa). A eluição dos hormônios foi realizada com 1 mL de metanol a 95%. As amostras foram novamente secas e o resíduo dissolvido em 1% de ácido acético, sendo o extrato passado através de colunas Oasis MCX® (troca catiônica).

Para quantificação dos hormônios ácidos (GAs, IAA, ABA, SA e JA), as frações foram eluídas com 100% de metanol contendo 1% de ácido acético. As citocininas foram recuperadas pela eluição com 60% de metanol e 5% de NH_4OH, obtendo-se a fração básica. As análises foram realizadas por

cromatografia líquida de ultra-alto desempenho (UHPLC, Accela 1250 Pump, Thermo Scientific®, Waltham, MA, EUA) acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (Q-Exactive Orbitrap, Thermo Fisher Scientific®, San Diego, CA, EUA).

2.9. Análise de dados

Os dados foram analisados conforme o delineamento experimental e a natureza das variáveis. A normalidade e a homogeneidade de variâncias foram verificadas previamente. As análises de variância (ANOVA) foram utilizadas para avaliar os efeitos da inoculação com *Beauveria amorpha*, da herbivoria por *Euschistus heros* e de sua interação.

Os ensaios de caracterização funcional do isolado de *B. amorpha* foram analisados de forma descritiva, sendo os resultados expressos como média ± desvio-padrão. As avaliações qualitativas foram interpretadas com base na presença ou ausência de halos e mudanças de coloração no meio de cultura. Os parâmetros fisiológicos obtidos por trocas gasosas, assim como as variáveis de crescimento vegetal, foram analisados em esquema fatorial considerando os fatores fungo e inseto, com análises conduzidas separadamente para cada tempo de avaliação. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A colonização endofítica foi expressa como frequência (%) e comparada entre tratamentos. Os dados hormonais foram padronizados (*z-score*) e analisados por correlação de Pearson ($p \leq 0,05$), sendo utilizadas redes hormonais para representar as correlações significativas entre os hormônios em cada tratamento. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico R (R Core Team 2024).

3. Resultados

3.1. Indicadores de promoção de crescimento de *Beauveria amorpha*

Tabela 1. Perfil funcional de *Beauveria amorpha* relacionado à promoção de crescimento vegetal.

Indicador	Quantitativo	Qualitativo	Conclusão
Fósforo (P)	6.24 ± 1.11 µg mL^{-1}	Halo: 10/10 placas (+)	Solubilização confirmada
AIA	1.08 ± 1.17 µg mL^{-1}	—	Produção detectável
ACC-desaminase	1135 ± 45 µmol mL^{-1}	Crescimento positivo	Atividade elevada
Sideróforos (CAS)	—	Pigmento: 10/10 (+)	Produção consistente

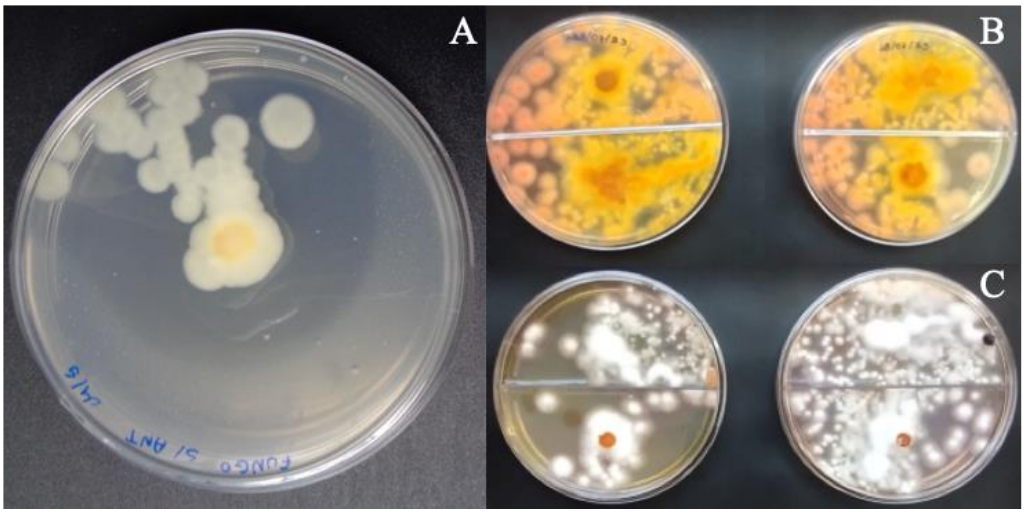


Figura 1. (A) Halo de solubilização formado ao redor do disco de colônia fúngica, evidenciando a capacidade de solubilização de fosfato em ensaio qualitativo. (B) Vista inferior da placa de Petri, destacando a produção de pigmentos rosados/amarelados indicativos da síntese de sideróforos pelo fungo. (C) Vista superior da mesma placa apresentada em (B), mostrando o crescimento fúngico associado à produção de pigmentos.

Os testes com o isolado de *Beauveria amorpha* indicaram que o isolado apresenta múltiplas funcionalidades associadas à promoção de crescimento vegetal e adaptação ao estresse. O isolado apresentou capacidade consistente de solubilização de fósforo, com média de 6.24 ± 1.11 µg mL^{-1} de P liberado em meio líquido (Tabela 1). Além disso, o ensaio qualitativo confirmou halos de solubilização em 10/10 placas (figura 1A), evidenciando atividade solubilizadora robusta e estável.

A produção detectável de AIA (1.08 ± 1.17 µg mL^{-1}) indica que o isolado sintetiza hormônios vegetais associados ao alongamento celular e desenvolvimento radicular (Tabela 1). A atividade de 1135 ± 45 µmol mL^{-1} representa um nível elevado da enzima ACC-desaminase (tabela 1), responsável pela degradação do ACC, precursor do hormônio estresse-etileno. O crescimento positivo no teste qualitativo reforça essa característica metabólica. O ensaio com meio CAS indicou produção consistente de sideróforos, com mudança de cor observada em 100% das placas (10/10) (figura 1B,1C). A produção de pigmentos amarelos ou alaranjados é típica da expressão de sideróforos.

Espostas morfofisiológicas de mudas de coqueiro submetidas ao ataque de insetos praga

3.2. Confirmação de inoculação de *Beauveria amorpha* em plantas de soja

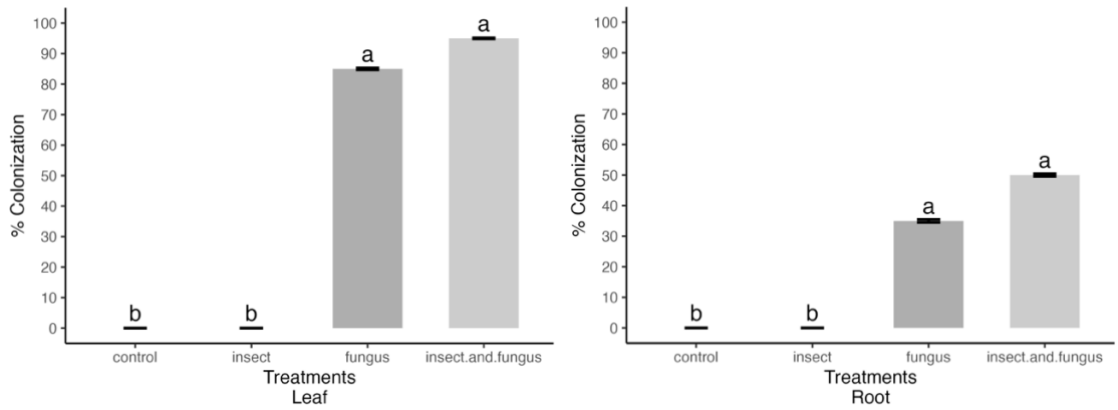


Figura 2. Colonização endofítica de *Beauveria amorpha* em plantas de soja. (A) Recuperação e confirmação do fungo a partir de folhas inoculadas, cultivadas

em placas de Petri. (B) Recuperação e confirmação do fungo a partir de raízes inoculadas, cultivadas em placas de Petri. As médias foram comparadas pelo teste F, seguido pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

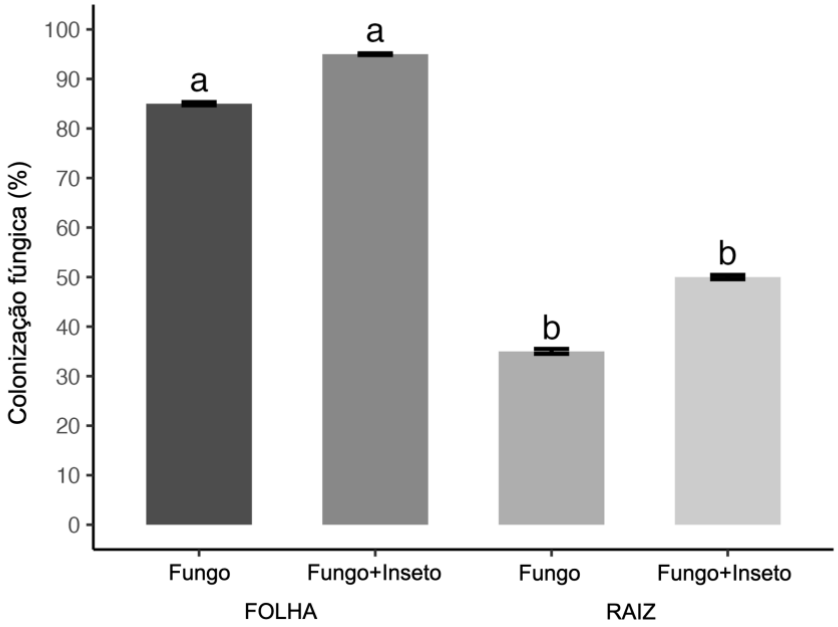


Figura 2. Colonização endofítica de *Beauveria amorpha* em plantas de soja (%). Recuperação e confirmação do fungo a partir de folhas e raízes inoculadas, cultivadas em placas de Petri. As médias foram comparadas pelo teste F, seguido pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não houve confirmação de colonização endofítica de *Beauveria amorpha* nas folhas e raízes dos tratamentos que não foram inoculados *com B. amorpha* (dados não exibidos). Por outro lado, a colonização endofítica por *B. amorpha* foi confirmada em tecidos vegetais das folhas e raízes de plantas que foram anteriormente inoculadas com o fungo (figura 2), evidenciando que o fungo se estabeleceu de forma eficiente nas folhas independentemente da presença do inseto. Apesar da colonização nos diferentes tecidos, foi observado diferença estatística entre os tecidos foliares e raízes. As folhas tiveram confirmação média de 90% independente da presença do fungo e as raízes tiveram valores de 35% no tratamento somente com fungo e aproximadamente 50%, mas sem diferença estatística entre eles. Logo, esses resultados demonstram que o fungo coloniza raízes em menor intensidade que folhas, mas ainda assim de forma consistente.

3.3. Análise dos atributos de crescimento das plantas de soja

Tabela 2. Análises biométricas de altura da planta (cm), diâmetro do colmo (mm) e teor de clorofila (unidades relativas) obtidas em duas avaliações: Dia 1 (início da floração) e Dia 2 (floração plena/início de emissão do estilete). As médias foram comparadas por meio de teste F, seguido pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamentos	Altura dia 1 (cm)			Altura dia 2 (cm)		
	Sem Inseto	Com Inseto	F	Sem Inseto	Com Inseto	F
Sem Fungo	42,7 Aa	34,5 Ab	11,7**	66,5 Aa	51,2 Ab	7,89*
Com Fungo	47,1 Aa	37,7 Ab	14,8**	70,7 Aa	61,7 Aa	2,75ns
F	3,13ns	1,83ns	---	0,61ns	3,74ns	---
Tratamento	Diâmetro dia 1 (mm)			Diâmetro dia 2 (mm)		
	Sem Inseto	Com Inseto	F	Sem Inseto	Com Inseto	F
Sem Fungo	1,48 Aa	1,34 Ba	1,64ns	3,01 Aa	2,96 Aa	0,03ns
Com Fungo	1,44 Aa	1,67 Aa	4,53ns	3,29 Aa	3,41 Aa	0,19ns
F	0,10ns	9,55*	---	1,43ns	3,21ns	---
Tratamento	Clorofila dia 1 (U.R.)			Clorofila dia 2 C		
	Sem Inseto	Com Inseto	F	Sem Inseto	Com Inseto	F
Sem Fungo	33,5 Bb	39,5 Aa	7,14*	28,9 Aa	23,7 Ba	2,76ns
Com Fungo	40,7 Aa	40,6 Aa	0,00ns	34,3 Aa	32,5 Aa	0,32ns
F	10,6**	0,30ns	---	3,01ns	8,02*	---

Letras minúsculas comparam as médias na linha e letras maiúsculas comparam as médias na coluna.

No Dia 1, a presença de insetos reduziu significativamente a altura das plantas tanto no tratamento sem fungo quanto no tratamento com fungo (tabela 2). Em plantas sem fungo, a altura caiu de 42,7 cm para 34,5 cm, enquanto em plantas inoculadas com fungo, a redução foi de 47,1 cm para 37,7 cm. Esses efeitos foram confirmados pelos valores significativos do teste F. Entretanto, não houve diferença significativa entre tratamentos fúngicos (fungo vs. sem fungo)

dentro de cada condição de inseto, sugerindo que o fungo não influenciou a altura inicial das plantas na ausência ou presença de herbivoria. Na segunda avalição, o padrão permaneceu semelhante para plantas sem fungo, onde os insetos reduziram a altura (66,5 para 51,2 cm). No entanto, quando o fungo estava presente, essa redução não ocorreu (70,7 vs. 61,7 cm; F não significativo), indicando que o fungo pode ter atenuado parcialmente o efeito negativo dos insetos na fase de floração plena.

O diâmetro no primeiro dia de avalição, apresentou interação parcial entre os fatores1 (tabela 2). Em plantas sem fungo, insetos reduziram o diâmetro, enquanto em plantas inoculadas houve leve aumento, embora não significativo. O efeito isolado dos insetos foi significativo (F = 9,55), sugerindo que a herbivoria afeta o espessamento inicial do colmo, independentemente da presença de fungo. No Dia 2, não houve diferenças significativas entre tratamentos, indicando que o diâmetro tende a estabilizar durante o desenvolvimento vegetativo, mesmo sob estresse biótico.

O fungo aumentou o teor de clorofila significativamente no primeiro dia de avalição (de 33,5 para 40,7 U.R.), enquanto insetos reduziram a clorofila apenas nas plantas sem fungo. Na segunda avaliação, o efeito dos insetos voltou a ser evidente apenas em plantas sem fungo, enquanto plantas inoculadas mantiveram teores de clorofila estáveis.

Tabela 3. Avaliações biométricas finais realizadas antes e após a colheita destrutiva das plantas. Foram mensurados: altura final da parte aérea (cm), comprimento da raiz (cm), massa seca da parte aérea (g) e massa seca das raízes (g). As médias foram comparadas pelo teste F, seguido pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tratamentos	Altura PA final (cm)			Comprimento da raiz (cm)		
	Sem Inseto	Com Inseto	F	Sem Inseto	Com Inseto	F
Sem Fungo	70,5 Aa	54,7 Ab	9,52*	36,7 Aa	33,1 Aa	1,39ns
Com Fungo	72,3 Aa	64,7 Aa	2,16ns	37,5 Aa	34,5 Aa	0,89ns

F	0,12ns	3,84ns	---	0,06ns	0,22ns	---

Tratamentos	MS Parte aérea (g)			MS Raiz (g)		
	Sem Inseto	Com Inseto	F	Sem Inseto	Com Inseto	F
Sem Fungo	12,6 Ba	9,92 Bb	12,4**	13,7 Aa	13,3 Ba	0,68ns
Com Fungo	16,7 Aa	13,8 Ab	14,3**	14,5 Aa	14,5 Aa	0,00ns
F	27,8**	25,2**	---	3,48ns	7,21*	---

PA: Parte aérea das plantas. MS: Massa seca. Letras minúsculas comparam as médias na linha e letras maiúsculas comparam as médias na coluna.

A altura final (tabela 3) da parte aérea foi reduzida em plantas que tiveram a presença de insetos e sem inoculação do fungo (de 70,5 para 54,7 cm), confirmando o efeito acumulado da herbivoria ao longo do ciclo. Entretanto, em plantas inoculadas com *B. amorpha*, essa redução não foi significativa (72,3 vs. 64,7 cm), sugerindo que o fungo pode aliviar parcialmente o impacto do dano causado pelos percevejos ao longo do desenvolvimento. O comprimento de raiz não apresentou diferenças significativas entre tratamentos (tabela 3), variando entre 33 e 37,5 cm, e não sendo afetado por insetos nem pelo fungo.

A massa seca (MS) aérea foi um dos parâmetros mais sensíveis ao efeito dos insetos. Em plantas sem fungo, insetos reduziram a MS de 12,6 g para 9,92 g. Em plantas inoculadas, embora a massa seca fosse maior no geral (16,7 g), os insetos também provocaram redução significativa (13,8 g). Além disso, o efeito do fungo foi marcante: plantas com *B. amorpha* apresentaram maior acúmulo de biomassa tanto sem insetos quanto com inseto. A massa seca da raiz não apresentou alterações significativas em função da herbívora ou do fungo. No entanto, o teste F apontou efeito significativo entre tratamentos dentro de colunas (presença de inseto), sugerindo alguma tendência de maior estabilidade radicular em plantas inoculadas.

3.4. Análises fisiológicas em plantas de soja

As respostas fisiológicas das plantas de soja foram avaliadas por meio de trocas gasosas em dois momentos distintos: imediatamente após a remoção de *Euschistus heros* (Dia 1-primeira avaliação) e alguns dias após o término da herbivoria, durante a floração plena (Dia 2-segunda avaliação). Esses dois pontos temporais permitiram distinguir respostas imediatas ao estresse herbívoro daquelas associadas a processos de recuperação e modulação tardia, especialmente em plantas inoculadas com *Beauveria amorpha*.

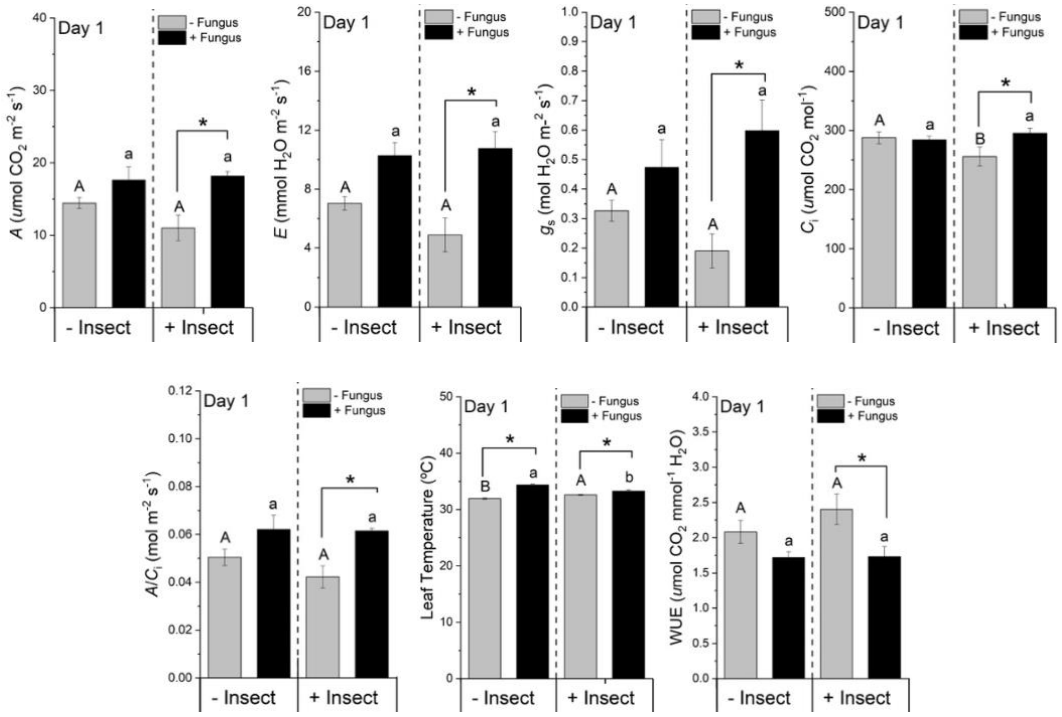


Figura 3. Respostas fisiológicas de plantas de soja avaliadas por trocas gasosas no Dia 1 (primeira avaliação), após o período experimental, em plantas inoculadas (+ Fungo) ou não (– Fungo com *Beauveria amorpha* e submetidas (+ Insect) ou não (– Insect) à herbivoria por *Euschistus heros*. São apresentados os parâmetros: Taxa líquida de assimilação de CO_2 (A), taxa de transpiração (E), condutância estomática (gs), concentração intercelular de CO_2 (Ci), eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci), temperatura foliar e eficiência no uso da água (WUE). As barras representam médias ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre

tratamentos (Tukey, $p \leq 0,05$). O asterisco (*) indica diferença significativa entre plantas inoculadas e não inoculadas dentro do mesmo nível de herbivoria.

Na primeira avaliação (Dia 1), observaram-se diferenças marcantes nos parâmetros fisiológicos em função da interação entre herbivoria e inoculação fúngica (figura 3). A taxa líquida de assimilação de CO_2 (A) foi significativamente reduzida pela herbivoria em plantas não inoculadas, enquanto plantas inoculadas com *B. amorpha* mantiveram valores elevados de fotossíntese, independentemente da presença prévia de insetos. Esse padrão indica que o fungo endofítico mitigou o impacto imediato da herbivoria sobre a atividade fotossintética e que há uma sensibilidade da fotossíntese à presença recente do inseto.

A taxa de transpiração (E) seguiu padrão semelhante. Em plantas sem fungo, a presença prévia do inseto resultou em redução da transpiração, enquanto plantas inoculadas mantiveram taxas elevadas e estáveis, mesmo após a herbivoria. A condutância estomática (gs) reforçou esse padrão fisiológico, onde plantas não inoculadas exibiram fechamento estomático após o ataque, enquanto plantas inoculadas apresentaram aumento ou manutenção da abertura estomática, sugerindo maior capacidade de ajuste estomático sob estresse.

A concentração intercelular de CO_2 (Ci) foi reduzida em plantas não inoculadas submetidas à herbivoria, evidenciando limitação estomática da fotossíntese. Em contraste, plantas inoculadas mantiveram valores estáveis de Ci, indicando que a assimilação de carbono foi preservada. A eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci) seguiu o mesmo padrão, com redução apenas em plantas não inoculadas, enquanto plantas com fungo mantiveram elevada eficiência bioquímica da fixação de carbono.

A temperatura foliar revelou respostas opostas entre os tratamentos. Em plantas não inoculadas, a herbivoria resultou em aumento da temperatura foliar, consistente com a redução da transpiração e do resfriamento evaporativo. Já em plantas inoculadas, a presença prévia do inseto esteve associada à redução da temperatura foliar, refletindo maior controle estomático e manutenção do fluxo

transpiratório. A eficiência no uso da água (WUE) não apresentou variações consistentes entre os tratamentos, indicando que, no curto prazo, os ajustes fisiológicos priorizaram a manutenção da fotossíntese em detrimento da economia hídrica, no entanto, foi observado que plantas com fungo mantiveram valores elevados e estáveis, sem queda de eficiência.

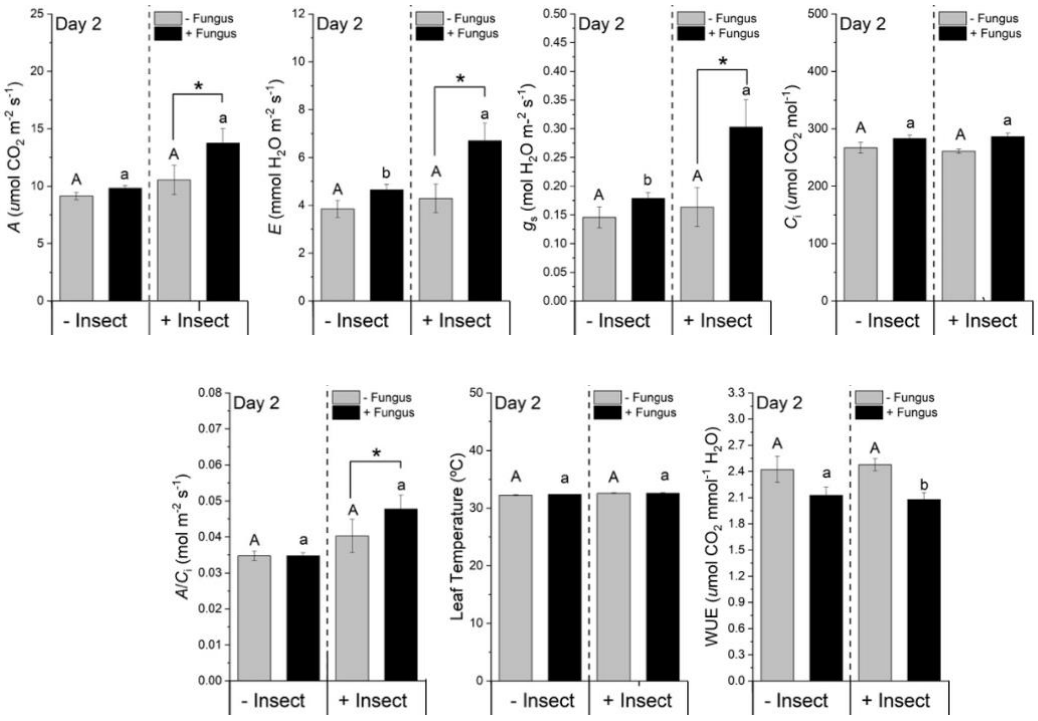


Figura 4. Respostas fisiológicas de plantas de soja avaliadas por trocas gasosas no Dia 2 (segunda avaliação), após o período experimental, em plantas inoculadas (+ Fungus) ou não (– Fungus) com *Beauveria amorpha* e submetidas (+ Insect) ou não (– Insect) à herbivoria por *Euschistus heros*. São apresentados os parâmetros: Taxa líquida de assimilação de CO_2 (A), taxa de transpiração (E), condutância estomática (gs), concentração intercelular de CO_2 (Ci), eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci), temperatura foliar e eficiência no uso da água (WUE). As barras representam médias ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos (Tukey, $p \leq 0,05$). O asterisco (*) indica efeito significativo do histórico de herbivoria dentro de cada condição fúngica.

Na segunda avaliação (Dia 2), realizado alguns dias após o fim da herbivoria e já na fase de floração plena, os parâmetros fisiológicos indicaram um padrão distinto daquele observado no Dia 1, sugerindo processos de recuperação e modulação tardia pelo fungo nas respostas da planta (figura 4). Para a taxa fotossintética (A), plantas sem fungo não apresentaram diferenças entre presença ou ausência prévia de insetos. Já plantas com fungo exibiram tendência de maior fotossíntese quando previamente atacadas, embora sem significância dentro do tratamento, mas com efeito significativo da herbivoria no modelo.

A transpiração (E) também refletiu essa resposta tardia, onde plantas com fungo e herbivoria apresentaram aumento significativo, indicando maior demanda evaporativa associada ao ganho fotossintético. A condutância estomática (gs) apresentou comportamento semelhante, onde plantas com fungo e com histórico herbivoria mostraram aumento significativo, enquanto plantas sem fungo permaneceram estáveis. Esse padrão sugere maior capacidade de regulação estomática e maior fluxo de CO_2 em plantas associadas ao fungo. Para Ci, não houve diferenças significativas entre tratamentos, embora plantas com fungo e inseto tenham mostrado tendência de valores mais altos.

A eficiência de carboxilação (A/Ci) aumentou em plantas com fungo e com histórico de herbivoria, e o efeito isolado do inseto foi significativo, indicando melhora do desempenho carboxilativo na presença do endófito. A temperatura foliar apresentou pequenas variações, com plantas inoculadas exibindo valores ligeiramente mais elevados, possivelmente associados ao aumento da atividade metabólica. A eficiência no uso da água (WUE) foi reduzida em plantas inoculadas com histórico de herbivoria, refletindo o aumento proporcional da transpiração em relação à assimilação de carbono, o que é consistente com um estado fisiológico ativo e de crescimento.

3.5. Análises hormonais

As análises de quantificação dos fitormônios mostrou que os diferentes tratamentos promoveram alterações expressivas no balanço hormonal das plantas de soja, tanto em relação às concentrações relativas dos hormônios individuais quanto à organização do perfil hormonal como um todo. As respostas variaram de acordo com cada tratamentos, sendo afetado pela presença de *Beauveria amorpha*, da herbivoria por *Euschistus heros* e/ou da interação entre ambos, mostrando uma modulação hormonal dependente do tratamento.

Na análise baseada em escores padronizados (Z-score), foi evidenciado diferenças claras no perfil hormonal relativo entre os tratamentos (figura 5). As plantas do controle apresentaram escores positivos para a maioria dos hormônios avaliados, incluindo giberelinas (GA1 e GA4), ácido abscísico (ABA), ácido indolacético (IAA), ácido jasmônico (JA), isopenteniladenina (iP) e trans-zeatina (tZ), indicando concentrações acima da média geral dos tratamentos. Por outro lado, plantas inoculadas apenas com *B. amorpha* apresentaram escores predominantemente negativos para praticamente todos os hormônios analisados, refletindo concentrações abaixo da média global. As plantas infestadas por *E. heros* exibiram um padrão distinto, caracterizado por escores positivos principalmente para ácido salicílico (SA) e dihidrozeatina (DHZ), enquanto os demais hormônios apresentaram valores próximos ou abaixo da média. No tratamento combinado (*B. amorpha* + inseto), observou-se um perfil intermediário, com redução relativa de giberelinas, ABA e IAA, manutenção moderada de JA e aumento relativo de tZ, indicando uma reorganização do perfil hormonal em resposta à interação fungo–inseto.

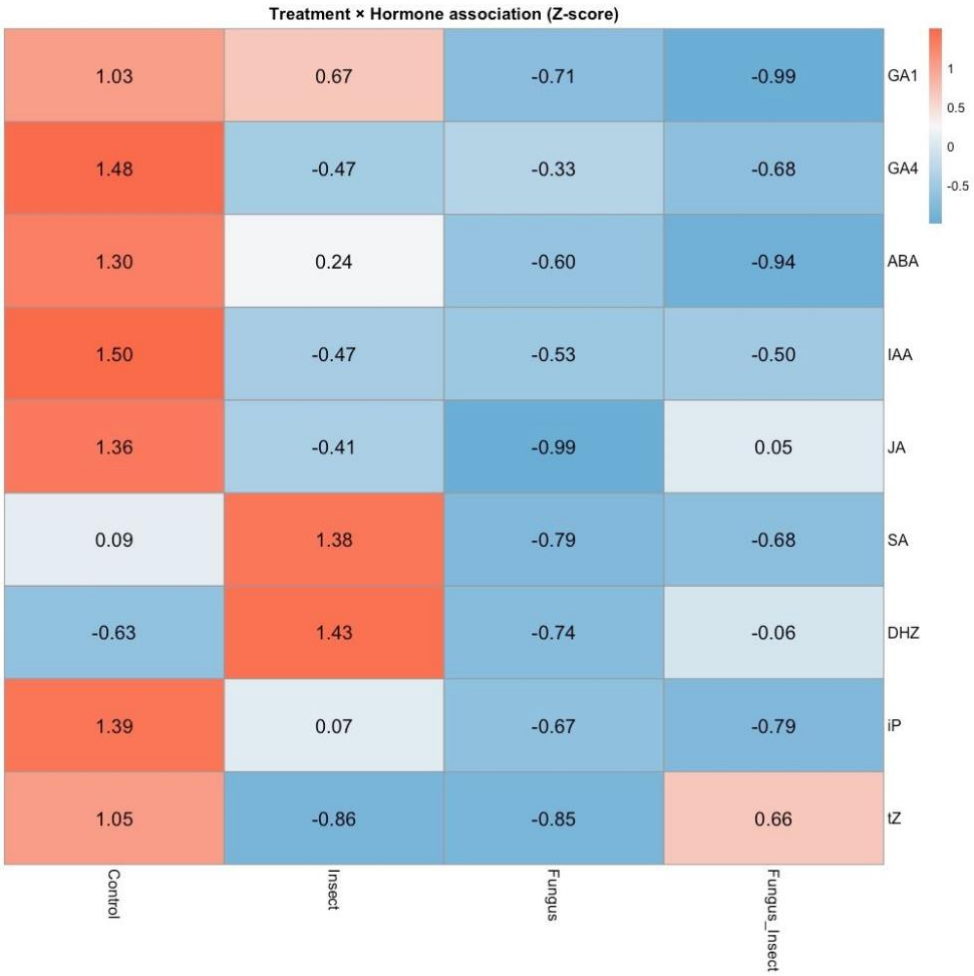


Figura 6. Associação entre tratamentos e hormônios vegetais expressa por escores padronizados (Z-score). Valores positivos indicam concentrações acima da média geral dos tratamentos para cada hormônio, enquanto valores negativos indicam concentrações abaixo da média. Giberelinas (GA1 e GA4), Ácido abscísico (ABA), Ácido indolacético (AIA), Ácido jasmônico (JA), Ácido salicílico (SA), dihidrozeatina (DHZ), Isopenteniladenina (iP) e Trans-zeatina (tZ).

A comparação geral dos perfis hormonais entre os tratamentos, por meio da correlação de Pearson, revelou coeficientes elevados entre todas as combinações (r variando de 0,95 a 1,00; $p < 0,01$), indicando alta similaridade na arquitetura geral do perfil hormonal entre os tratamentos analisados (figura 6). O tratamento controle apresentou alta correlação com os tratamentos contendo fungo, inseto ou ambos, assim como os tratamentos entre si, demonstrando que, apesar das diferenças na intensidade relativa das concentrações hormonais, o

conjunto de hormônios envolvidos permaneceu amplamente conservado entre as condições experimentais.

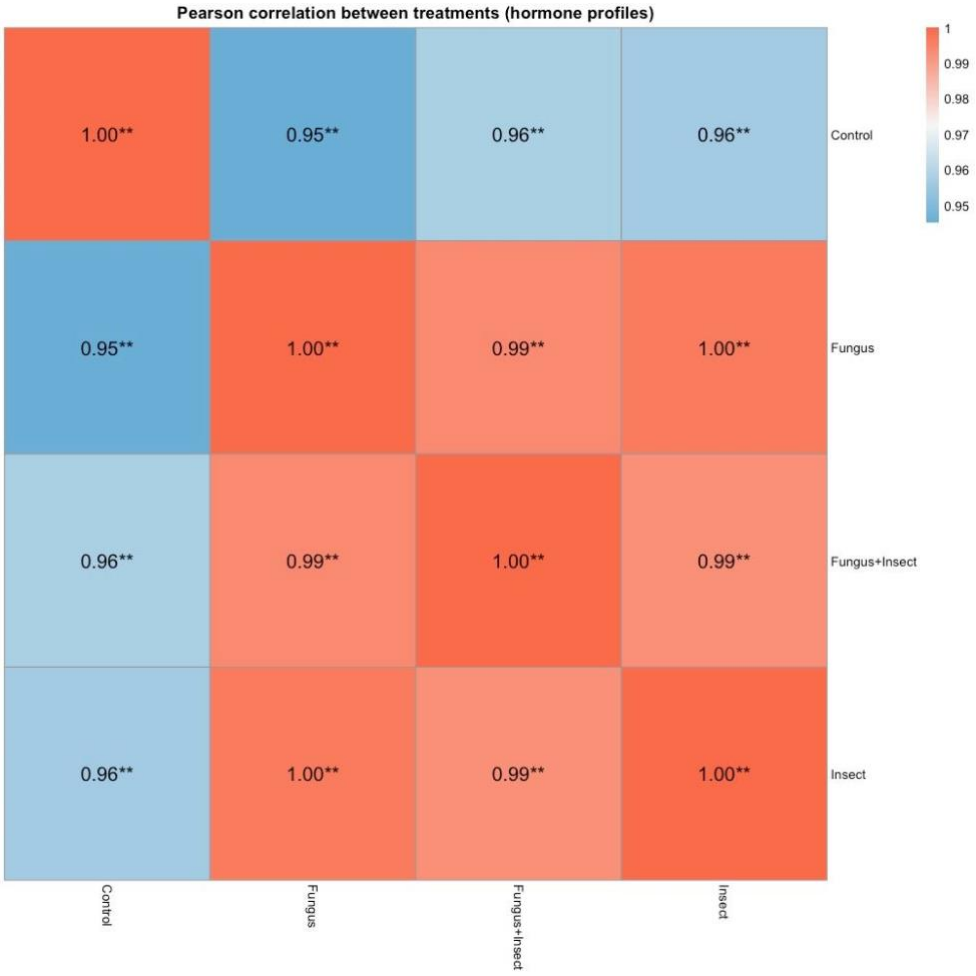


Figura 7. Correlação de Pearson entre os perfis hormonais médios dos tratamentos (controle, inseto, fungo e fungo + inseto). Os valores representam os coeficientes de correlação (r), com significância indicada por ** ($p < 0,01$).

A análise das correlações entre hormônios dentro de cada tratamento (controle, inseto, fungo e inseto+fungo) revelou diferenças marcantes na organização interna das redes hormonais (figura 7). No tratamento controle, foi observado uma rede altamente integrada, com numerosas correlações fortes, tanto positivas quanto negativas, envolvendo hormônios associados ao crescimento, à defesa e ao estresse. Em plantas infestadas por *E. heros*, a rede hormonal demostrou ainda maior densidade de correlações fortes, com destaque

para associações entre SA, JA, ABA, IAA e citocininas. Por outro lado, plantas inoculadas apenas com *B. amorpha* exibiram uma rede hormonal menos integrada, caracterizada por redução no número e na intensidade das correlações entre os hormônios. No tratamento combinado (*B. amorpha* + inseto), a rede apresentou um padrão intermediário, com manutenção de algumas correlações associadas à defesa, porém com menor integração geral quando comparada ao tratamento com inseto isolado.

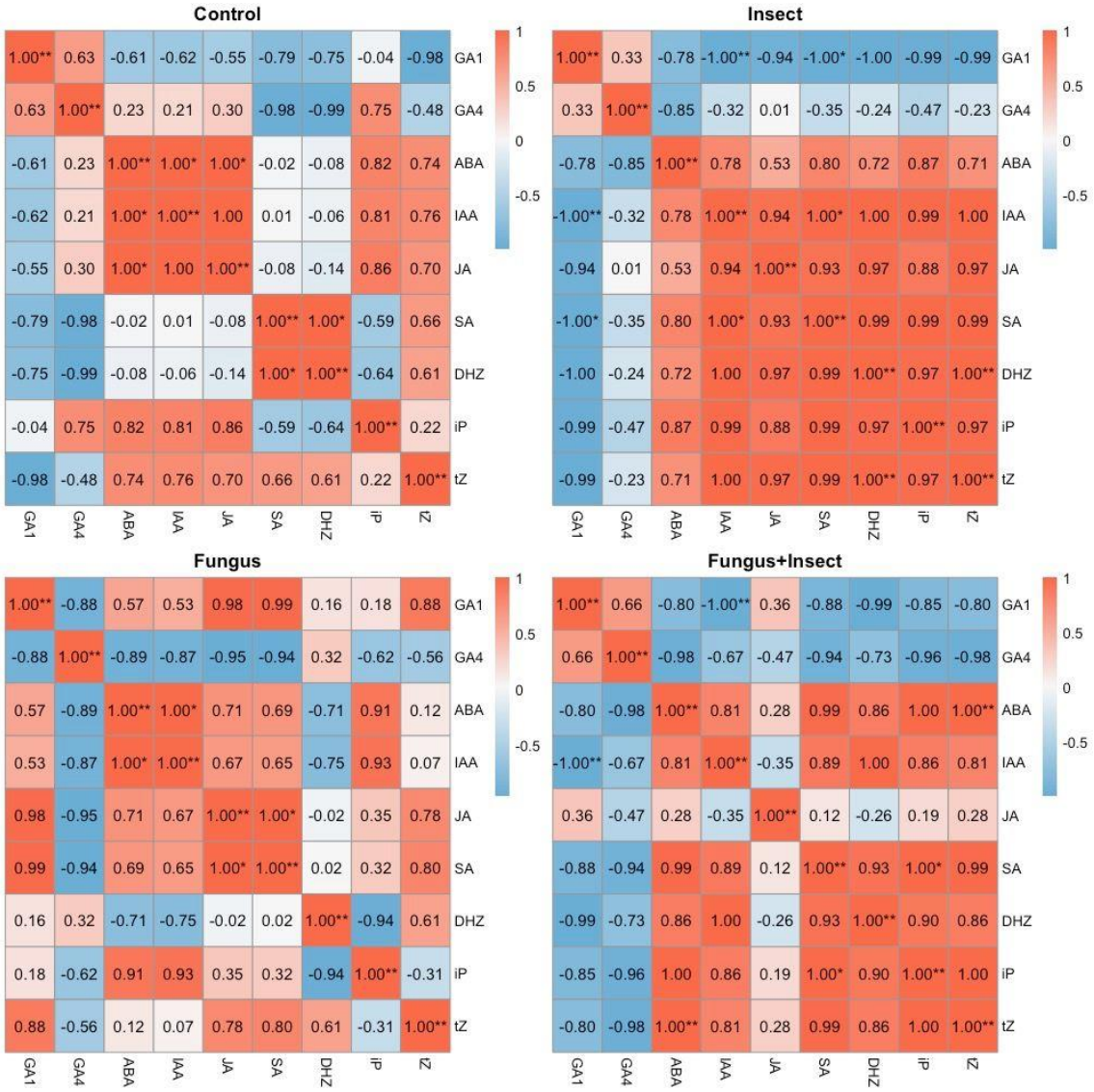


Figura 7**.** Matrizes de correlação de Pearson entre hormônios vegetais dentro de cada tratamento (controle, inseto, fungo e fungo + inseto). As cores indicam a direção e a intensidade das correlações, variando de correlações negativas (azul) a positivas (laranja).

De forma conjunta, os resultados indicam que os tratamentos não alteraram a identidade do conjunto hormonal envolvido, mas promoveram mudanças consistentes na intensidade relativa das concentrações hormonais e, principalmente, na estrutura das correlações hormonais dentro de cada condição experimental

4. Discussão

Os resultados demonstram que a colonização endofítica de soja pelo isolado de *Beauveria amorpha* promove uma reprogramação fisiológica sistêmica que aumenta a tolerância da planta à herbivoria por *Euschistus heros* (Bastías et al., 2022; Lu et al., 2021; Poudel et al., 2021). Essa resposta não se manifesta por intensificação de mecanismos clássicos de defesa, mas por um ajuste coordenado entre metabolismo primário, fisiologia fotossintética, crescimento vegetal e sinalização hormonal(Aerts et al., 2021; Poorter et al., 2012), resultando na manutenção da assimilação de carbono e do desenvolvimento mesmo sob estresse biótico. Logo, os efeitos observados refletem um estado fisiológico mais eficiente e metabolicamente estável, e não uma simples ativação exacerbada de respostas defensivas (V. Verma et al., 2016)

A interpretação desses efeitos nas plantas é apoiada pela confirmação da colonização endofítica de *B. amorpha* exclusivamente em plantas inoculadas (Russo et al., 2015a, 2019; Wei et al., 2020b). O reisolamento do fungo a partir de tecidos da soja confirmou a presença do fungo apenas nos tratamentos inoculados, enquanto não foi detectada colonização fúngica em plantas controle ou infestadas apenas por insetos. Esse resultado é fundamental para estabelecer a relação entre a presença do fungo nos tecidos vegetais e as respostas fisiológicas, hormonais e de crescimento observadas, descartando efeitos indiretos ou ambientais como explicação alternativa.

O ensaio unicamente com o fungo mostrou que a base funcional dessa resposta está associada às capacidades metabólicas do isolado de *B. amorpha*, que apresentou características típicas de microrganismos promotores de crescimento vegetal (Baron & Rigobelo, 2022; Taheri, 2025). A solubilização de fósforo, confirmada qualitativa e quantitativamente, pode ter contribuído para melhorar o status nutricional das plantas, favorecendo processos centrais da fotossíntese, como a síntese de ATP, a regeneração de RuBP e o transporte eletrônico (Khan et al., 2023; Pang et al., 2024). Esses processos são altamente dependentes da disponibilidade de fósforo, e sua limitação está diretamente associada à redução da eficiência fotossintética e do crescimento vegetal. Assim, a maior estabilidade da assimilação de carbono observada em plantas inoculadas com *B. amorpha* encontra respaldo direto nessa funcionalidade fúngica.

A produção detectável de ácido indolacético IAA pelo isolado, embora em níveis moderados, é consistente e esperado do comportamento de fungos endofíticos funcionais, quando comparada a bactérias rizosféricas clássicas (Bastías et al., 2022; Lu et al., 2021; Taheri, 2025). Nisso, há um equilíbrio onde os fungos endofíticos atuam modulando a sensibilidade hormonal dos tecidos vegetais, e não elevando sistemicamente os níveis de auxina (Baron & Rigobelo, 2022; R. Liu et al., 2023; Morales-Vargas et al., 2024). Além disso, é verificado que em sistemas endofíticos, pequenas quantidades de auxina microbiana são suficientes para favorecer crescimento radicular, absorção de água e nutrientes, desde que o metabolismo primário esteja funcionalmente ativo(Jing et al., 2023; Suebrasri et al., 2020; Zhang et al., 2022). Esse padrão é coerente com os resultados observados, nos quais plantas inoculadas apresentaram maior crescimento e acúmulo de biomassa mesmo sob baixos níveis endógenos de IAA(Jing et al., 2023; Peleg & Blumwald, 2011; Zhang et al., 2022).

A elevada atividade de ACC-desaminase observada pelo isolado de *B. amorpha* representa um mecanismo particularmente relevante para interpretar a estabilidade das respostas fisiológicas e hormonais observadas. (Gamalero et al., 2023; Orozco-Mosqueda et al., 2020). Ao degradar o ACC, precursor imediato do etileno, o fungo reduz a síntese desse hormônio associado ao estresse, prevenindo respostas como senescência precoce, inibição do

crescimento e fechamento estomático excessivo, o que causa um custo energético elevado para a planta (Rehner & Buckley, 2005; Taheri, 2025). Esse mecanismo fornece uma explicação fisiológica consistente para a manutenção da condutância estomática, da transpiração e da assimilação de CO_2 em plantas inoculadas, mesmo após a herbivoria. Adicionalmente, a produção de sideróforos sugere uma contribuição funcional para a aquisição de ferro(Dellagi et al., 2009; Gu et al., 2025), micronutriente essencial para a síntese de clorofila e para o funcionamento do aparato fotossintético, o que se reflete na estabilidade dos teores de clorofila e no desempenho fotossintético das plantas associadas ao fungo (Bar-Ness et al., 1992; Tavallali & Darvishzadeh, 2025).

Os dados de trocas gasosas avaliadas em plantas de soja e realizada em momentos diferentes, geram um eixo integrado que conecta essas capacidades funcionais do fungo às respostas hormonais e aos atributos de crescimento da planta. Em plantas sem fungo, a infestação por *E. heros* resultou em reduções significativas na taxa fotossintética, na condutância estomática e na transpiração, acompanhadas por alterações na concentração intercelular de CO_2 e aumento da temperatura foliar (Bharath et al., 2021; Peng et al., 2022; Singh & Roychoudhury, 2023). Esse conjunto de respostas caracteriza um estado fisiológico típico de estresse biótico, associado à limitação difusiva e bioquímica da fotossíntese e à redução do resfriamento evaporativo. Por outro lado, plantas inoculadas com *B. amorpha* mantiveram valores elevados e estáveis desses parâmetros fisiológicos imediatamente após a herbivoria semelhantes às plantas não estressadas, indicando que a colonização endofítica atenuou a percepção e a intensidade da resposta ao estresse (Du et al., 2024; H. Li et al., 2023).

Na segunda avaliação de trocas gasosas, realizada quando a planta já estava há dias sem o ataque do inseto e no estado de floração plena, esse padrão no perfil fisiológico tornou-se ainda mais evidente. Plantas que foram inoculadas com o fungo e anteriormente infestadas com *E. heros* apresentaram aumento da assimilação de CO_2, da condutância estomática e da transpiração, refletindo um estado fisiológico ativo e funcionalmente eficiente (Molina-Montenegro et al., 2016). Embora esse aumento tenha sido acompanhado por redução da eficiência no uso da água, tal resposta é consistente com uma

estratégia metabólica voltada ao crescimento e à assimilação de carbono, e não com estresse hídrico. Esse desempenho fisiológico explica o maior acúmulo de biomassa observado em plantas inoculadas, evidenciando que o crescimento superior resultou de maior eficiência metabólica, e não de estímulo hormonal excessivo(Blum, 2005; Flexas et al., 2004).

As respostas fisiológicas observadas refletiram-se diretamente nos atributos de crescimento das plantas. A presença de *B. amorpha* atenuou os efeitos negativos da herbivoria sobre a altura da parte aérea, especialmente nas avaliações dias após a retiradas dos insetos, nas quais plantas inoculadas mantiveram crescimento comparável ao controle não foram infestadas por E. heros (Poorter et al., 2012). Além do mais, plantas inoculadas com fungo apresentaram maiores teores de clorofila, particularmente nos estágios iniciais após a herbivoria, indicando maior integridade do aparato fotossintético(Cortleven et al., 2019; Zwack & Rashotte, 2015). Esse padrão é consistente com a manutenção da assimilação de carbono observada pelos dados de trocas gasosas e sugere menor degradação de pigmentos fotossintéticos sob estresse biótico.

O acúmulo de matéria seca (MS) reforça essa interpretação integrada dos resultados. As plantas inoculadas com *B. amorpha* apresentaram maior MS da parte aérea(Morales-Vargas et al., 2024; Poorter et al., 2012), tanto na ausência quanto na presença de *E. heros*, comprovando que a manutenção da fotossíntese e da condutância estomática se traduziu em maior incorporação de carbono estrutural ao longo do ciclo. Embora a herbivoria por *E. heros* tenha reduzido a MS em todos os tratamentos, esse efeito foi significativamente atenuado em plantas inoculadas com fungo, indicando que o fungo contribuiu para sustentar o crescimento mesmo sob estresse x. A ausência de alterações marcantes na MS radicular sugere que os principais benefícios da associação endofítica se manifestam predominantemente na parte aérea, onde ocorrem as trocas gasosas e a assimilação de carbono.

Esses padrões de crescimento e acúmulo de biomassa observados nos tratamentos analisados amparam o contexto fisiológico necessário para a interpretação dos dados hormonais, indicando que variações nas concentrações

e na organização das redes hormonais refletem estados de eficiência metabólica distintos, e não limitações ao desenvolvimento da planta (Peleg & Blumwald, 2011; Taheri, 2025). Em plantas controle, os elevados níveis de IAA, ABA, JA e SA refletem um cenário de sinalização compensatória, típico de plantas que enfrentam restrições fisiológicas e tentam sustentar crescimento e defesa por meio da intensificação hormonal (Jing et al., 2023; Pieterse et al., 2012; V. Verma et al., 2016; Zhang et al., 2022). Por outro lado, plantas inoculadas com *B. amorpha* apresentaram níveis reduzidos desses hormônios, mesmo quando expostas à herbivoria de *E. heros*, indicando que a manutenção do crescimento e da fotossíntese não depend(Bastías et al., 2022; Lu et al., 2021; Patkar & Naqvi, 2017)2(Bastías et al., 2022; Lu et al., 2021; Patkar & Naqvi, 2017).

Os altos teores de ácido indolacético (AIA) em plantas controle, embora geralmente associados ao crescimento, refletem um cenário de sinalização hormonal compensatória, ativada quando a eficiência metabólica e a assimilação de carbono são limitadas(Jing et al., 2023; Peleg & Blumwald, 2011; Zhang et al., 2022).Nessas condições, o aumento de AIA atua como tentativa de sustentar a expansão celular sob restrições fisiológicas(Jing et al., 2023; Taheri, 2025; Zhang et al., 2022). Em contraste, plantas inoculadas com fungo apresentaram maior crescimento apesar de menores concentrações endógenas de AIA, apoiando que a expansão celular foi sustentada principalmente por maior eficiência fotossintética, maior disponibilidade de carbono e melhor balanço energético(Bastías et al., 2022; Liu et al., 2023; Lu et al., 2021; Morales-Vargas et al., 2024). Esse padrão é coerente com a produção apenas detectável de AIA pelo isolado fúngico de *B. amorpha*, indicando que a atuação do endófito ocorre de forma localizada e regulatória, modulando a sensibilidade ao AIA endógeno, e não por elevação sistêmica do hormônio na planta. Logo, a promoção de crescimento pelo isolado fúngico de *B. amorpha* está associada à otimização metabólica e ao ajuste fino do balanço hormonal, e não à indução compensatória de auxina(Baron & Rigobelo, 2022; Taheri, 2025).

Os níveis mais elevados de ácido abscísico (ABA) observados em plantas controle e, plantas infestadas por *E. heros* sem inoculação fúngica, indicam uma resposta fisiológica clássica ao estresse, associada ao fechamento estomático e

à limitação da assimilação de CO_2, em acordo com os padrões de trocas gasosas registrados neste estudo (Bharath et al., 2021; Singh & Roychoudhury, 2023). Por outro lado, a redução do ABA em plantas inoculadas com *B. amorpha*, mesmo sob herbivoria do inseto sugador *E. heros*, indica que a colonização endofítica modulou a resposta hormonal da planta de soja, atenuando a ativação excessiva de mecanismos de estresse(Taheri, 2025). Evidências mostram que fungos entomopatogênicos endofíticos, como *Beauveria* e *Metarhizium*, podem interferir na sinalização do ABA, promovendo maior estabilidade fisiológica e menor custo metabólico associado à defesada planta (Hu and Bidochka, 2021).

As citocininas apresentaram respostas diferenciais que refletem ajustes finos no balanço entre crescimento e estresse em plantas de soja (Osugi & Sakakibara, 2015; Vinciarelli et al., 2025). A elevação da dihidrozeatina (DHZ) em plantas infestadas por *E. heros* indica uma resposta adaptativa típica ao estresse biótico, uma vez que essa citocinina, por ser metabolicamente mais estável, está frequentemente associada à manutenção mínima das funções celulares sob condições adversas do meio(Taheri, 2025; Vinciarelli et al., 2025). Em contraste, a redução concomitante de isopenteniladenina (iP) e trans-zeatina (tZ) nesses tratamentos sugere comprometimento de vias hormonais diretamente ligadas à promoção do crescimento, à atividade fotossintética e ao atraso da senescência, em concordância com o menor desempenho fisiológico observado pelos dados de trocas gasosas e com a redução no acúmulo de biomassa(Cortleven et al., 2019; Osugi & Sakakibara, 2015; Vinciarelli et al., 2025; Zwack & Rashotte, 2015). Por outro lado, a manutenção relativa de iP e tZ em plantas inoculadas com *B. amorpha*, mesmo sob herbivoria, indica que a colonização endofítica contribuiu para a preservação da sinalização citocinínica associada ao crescimento e à estabilidade do aparato fotossintético(R. Liu et al., 2023; Taheri, 2025). Evidências demonstram que citocininas, especialmente tZ, desempenham papel central na manutenção da atividade fotossintética, na integridade dos cloroplastos e no atraso da senescência foliar, efeitos compatíveis com os maiores valores de assimilação de carbono, condutância estomática e crescimento observados em plantas inoculadas com fungo(Cortleven et al., 2019; Osugi & Sakakibara, 2015; Vinciarelli et al., 2025; Zwack & Rashotte, 2015).

Os hormônios de defesa em plantas ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (AS) também apresentaram modulação compatível com um estado fisiológico mais eficiente. Em plantas infestadas por *E. heros* sem inoculação fúngica, os níveis elevados desses hormônios caracterizam respostas defensivas intensas, frequentemente associadas à supressão da fotossíntese e ao redirecionamento de recursos metabólicos para a defesa, configurando um trade-off entre crescimento e defesa (Fang et al., 2025; Nabity et al., 2013; X. Wang et al., 2024). Em contraste, plantas de soja inoculadas com *B. amorpha* apresentaram concentrações mais moderadas de JA e SA, indicando que a resposta defensiva foi modulada e não exacerbada, reduzindo as penalidades metabólicas associadas à defesa intensa (Bastías et al., 2022; Lu et al., 2021; Thaler et al., 2012).A modulação fina entre os caminhos de JA e SA também é conhecida por resultar em interações crosstalk que equilibram as respostas defensivas e preservam processos fisiológicos essenciais, como a atividade fotossintética e o crescimento vegetativo(Fang et al., 2025; Nabity et al., 2013; Thaler et al., 2012; L. Wang & Wu, 2013).

A análise das correlações e das redes hormonais fornece um nível adicional de compreensão desses processos (Aerts et al., 2021). Embora os perfis hormonais apresentem correlações elevadas entre tratamentos, indicando a preservação da arquitetura básica da sinalização hormonal, a organização das redes revelou diferenças marcantes na conectividade entre hormônios. Plantas controle e infestadas sem *B. amorpha* apresentaram redes altamente integradas, típicas de estados fisiológicos sensíveis e metabolicamente custosos, nos quais múltiplas vias são ativadas simultaneamente (Conrath et al., 2015; Mauch-Mani et al., 2025). Em contraste, plantas inoculadas exibiram redes menos integradas, com menor número de correlações fortes, indicando maior autonomia entre vias hormonais e controle mais fino das respostas. O tratamento combinado fungo + inseto apresentou uma rede intermediária, sugerindo equilíbrio entre ativação defensiva e manutenção do metabolismo primário.

Em conjunto, os resultados indicam que a colonização endofítica por *B. amorpha* não promove resistência baseada em defesas químicas intensas, mas sim uma forma de tolerância fisiológica ao ataque de *E. heros*. Essa tolerância é sustentada pela manutenção da eficiência fotossintética, pela reorganização do

balanço hormonal e pela redução do custo metabólico associado às respostas ao estresse (Bastías et al., 2022; Lu et al., 2021; Taheri, 2025). Ao atuar como modulador sistêmico da fisiologia vegetal*, B. amorpha* amplia o espectro funcional conhecido do gênero *Beauveria*, tradicionalmente reconhecida como fungo entomopatogênico (Cheong et al., 2020; Clifton et al., 2023; Ortiz-Urquiza et al., 2010; Zimmermann, 2007), reposiosionado como um componente promissor em estratégias biológicas multifuncionais para o manejo sustentável da cultura da soja.

5. Conclusão

Foi verificado que fungo entomopatogênico *Beauveria amorpha* atua como endófito funcional em soja, promovendo uma forma de tolerância fisiológica ao ataque do inseto sugador *Euschistus hero*s, baseada na manutenção da eficiência fotossintética, do crescimento vegetal e da estabilidade metabólica. A colonização endofítica foi confirmada exclusivamente em plantas inoculadas com *B. amorpha* e esteve associada à preservação da assimilação de carbono, maior acúmulo de biomassa aérea e estabilidade dos teores de clorofila, mesmo sob herbivoria de *E. hero*s. Esses efeitos não resultaram da intensificação de defesas hormonais clássicas, mas de uma reorganização fina do balanço hormonal e da conectividade entre vias de sinalização, reduzindo custos metabólicos associados ao estresse. A modulação das trocas gasosas e das redes hormonais indica que fungo *B. amorpha* atua como regulador sistêmico da fisiologia vegetal, ampliando o espectro funcional conhecido do gênero *Beauveria*. Os resultados demonstram que *B. amorpha* promove tolerância fisiológica à herbivoria por meio da manutenção da eficiência fotossintética e do crescimento vegetal, e não pela intensificação de defesas clássicas, destacando seu potencial como agente multifuncional no manejo sustentável da soja

Referencias

Aerts N, Pereira Mendes M, Van Wees SCM (2021) Multiple levels of crosstalk in hormone networks regulating plant defense. **Plant Journal** 105:489-504.

Ahsan SM, Injamum-Ul-Hoque M, Das AK, Rahman MM, Mollah MMI, Paul NC, Choi HW (2024) Plant–entomopathogenic fungi interaction: recent progress and future prospects on endophytism-mediated growth promotion and biocontrol. **Plants** 13:1420.

Altaf N, Ullah MI, Afzal M, Arshad M, Ali S, Rizwan M, Al-Shuraym LA, Alhelaify SS, Sayed S (2023) Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in maize plants affects the fitness of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Microorganisms** 11:1067.

Aravinthraju K, Shanthi M, Murugan M, Srinivasan R, Maxwell LA, Manikanda Boopathi N, Anandham R (2024) Endophytic entomopathogenic fungi: their role in enhancing plant resistance, managing insect pests, and synergy with management routines. **Journal of Fungi** 10:865.

Bacha AL, Da Silva Santos RT, De Souza Rodrigues J, Oliveira DS, Almeida GM, Ferreira ME (2024) Trinexapac-ethyl dose–response curve for *Eucalyptus* growth and hormonal crosstalk between leaf and shoot apical bud. **Journal of Plant Growth Regulation** 43:4365-4383.

Bar-Ness E, Hadar Y, Chen Y, Shanzer A, Libman J (1992) Iron uptake by plants from microbial siderophores: a study with 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-desferrioxamine as fluorescent ferrioxamine B analog. **Plant Physiology** 99:1329-1335.

Baron NC, Rigobelo EC (2022) Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. **Mycology** 13:39-55.

Bastías DA, Gundel PE, Johnson RD, Gianoli E (2022) How and when fungal endophytes can eliminate the plant growth–defence trade-off: mechanistic perspectives. **New Phytologist** 235:388-390.

Bharath P, Gahir S, Raghavendra AS (2021) Abscisic acid-induced stomatal closure: an important component of plant defense against abiotic and biotic stress. **Frontiers in Plant Science** 12:615114.

Blum A (2005) Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential – are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? **Australian Journal of Agricultural Research** 56:1159-1168.

Bueno AF, Paula-Moraes SV, Gazzoni DL, Pomari AF (2013) Economic thresholds in soybean-integrated pest management: old concepts, current adoption, and adequacy. **Neotropical Entomology** 42:439-447.

Campos RA, Arruda W, Boldo JT, Da Silva MV, De Barros NM, De Azevedo JL (2005) *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. **Current Microbiology** 50:257-261.

Cavalcante Silva C, Laumann RA, Blassioli MC, Pareja M, Borges M (2008) *Euschistus heros* mass rearing technique for the multiplication of *Telenomus podisi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 43:575-580.

Cheong PCH, Glare TR, Rostás M, Haines S, Brookes JJ, Ford S (2020) Lack of involvement of chitinase in direct toxicity of *Beauveria bassiana* cultures to the aphid *Myzus persicae*. **Journal of Invertebrate Pathology** 169:107281.

Clifton EH, Castrillo LA, Jaronski ST, Hajek AE (2023) Cryptic diversity and virulence of *Beauveria bassiana* recovered from *Lycorma delicatula* (spotted lanternfly) in eastern Pennsylvania. **Frontiers in Insect Science** 3:1127682.

onrath U, Beckers GJM, Langenbach CJG, Jaskiewicz MR (2015) Priming for enhanced defense. **Annual Review of Phytopathology** 53:97-119.

Cortleven A, Leuendorf JE, Frank M, Pezzetta D, Bolt S, Schmülling T (2019) Cytokinin action in response to abiotic and biotic stresses in plants. **Plant, Cell & Environment** 42:998-1018.

Dalla Nora D, Piovesan BC, Bellé C, Stacke RS, Balardin RR, Guedes JVC, Cargnelutti Filho A (2021) Isolation and evaluation of entomopathogenic fungi against the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera:

Pentatomidae) under laboratory conditions. **Biocontrol Science and Technology** 31:22-34.

De F Bueno A, Sutil WP, Roswadoski L, Colmenarez YC (2024) Augmentative biological control of stink bugs on soybean: the Brazilian scenario. **CABI Agriculture and Bioscience** 5:63.

De J, Ferreira P, Soares M, Carvalho T, Santos R (2020) Comunicado técnico 148. Seropédica: Embrapa Agrobiologia.

De Souza DA, Lopes RB, Humber RA, Faria M (2020) Assessment of the diversity of Brazilian entomopathogenic fungi in the genus *Beauveria*. **Journal of Invertebrate Pathology** 171:107339.

Dellagi A, Segond D, Fagard M, Rochange S, Expert D (2009) Microbial siderophores exert a subtle role in *Arabidopsis*during infection by manipulating the immune response and the iron status. **Plant Physiology** 150:1687-1696.

Du B, Haensch R, Alfarraj S, Rennenberg H (2024) Strategies of plants to overcome abiotic and biotic stresses. **Biological Reviews** 99:1524-1536.

Fang X, Xie Y, Yuan Y, Zhang L, Wang J (2025) The role of salicylic acid in plant defense responses against biotic stresses. **Plant Hormones** 1:100003.

Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G, Sharkey TD (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. **Plant Biology** 6:269-279.

Food and Agriculture Organization (FAO) (2025) FAOSTAT – Crop production (soja). Disponível em: https://www.fao.org/faostat/. Acesso em: 07 de nov. de. 2025.

Gamalero E, Lingua G, Glick BR (2023) Ethylene, ACC, and the plant growth-promoting enzyme ACC deaminase. **Biology** 12:1182.

Goldstein AH (1986) Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. **American Journal of Alternative Agriculture** 1:51-57.

Gu S, Wang N, Zheng Y, Li Z, Zhang H, Xu J (2025) Integrating microbial siderophores into concepts of plant iron nutrition. **Nature Plants** 11:115-126.

He Z, Webster S, He SY (2022) Growth–defense trade-offs in plants. **Current Biology** 32:R634-R639.

Hu S, Bidochka MJ (2021) Abscisic acid implicated in differential plant responses of *Phaseolus vulgaris* during endophytic colonization by *Metarhizium* and pathogenic colonization by *Fusarium*. **Scientific Reports** 11:11180.

Ikram M, Ali N, Jan G, Ahmad N, Rahman IU, Ali I, Khan A (2023) Isolation of endophytic fungi from halophytic plants and their identification and screening for auxin production and other plant growth-promoting traits. **Journal of Plant Growth Regulation** 42:4707-4723.

Instituto Agronômico de Campinas (2022) Boletim 100: recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. Campinas: IAC.

Jing H, Wilkinson EG, Sageman-Furnas K, Strader LC (2023) Auxin and abiotic stress responses. **Journal of Experimental Botany** 74:7000-7014.

Khan F, Siddique AB, Shabala S, Ali S, Zhou M (2023) Phosphorus plays key roles in regulating plants' physiological responses to abiotic stresses. **Plants** 12:1465.

Li C, Nong W, Boncan DAT, Chen X, Li Y, Zhang Y (2024) Elucidating the ecophysiology of soybean pod-sucking stinkbug *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae) based on de novo genome assembly and transcriptome analysis. **BMC Genomics** 25:1143.

Li H, Xu L, Wu W, Li Y, Zhang X (2023) Infestation by the piercing–sucking herbivore *Nilaparvata lugens* systemically triggers JA- and SA-dependent defense responses in rice. **Biology** 12:820.

Liu R, Yang L, Zou Y, Wu Q (2023) Root-associated endophytic fungi modulate endogenous auxin and cytokinin levels to improve plant biomass and root morphology of trifoliate orange. **Horticulture Plant Journal** 9:463-472.

Lu H, Wei T, Lou H, Xu Y, Wang H (2021) A critical review on communication mechanism within plant-endophytic fungi interactions to cope with biotic and abiotic stresses. **Journal of Fungi** 7:719.

Marassatto CM, Ferreira LP, Couceiro JDC, De Oliveira MR, Guidolin AS, Delalibera I Jr (2025) *Beauveria bassiana* triggers soybean systemic resistance and causes sublethal effects in *Spodoptera frugiperda*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 174:236-250

Mauch-Mani B, Baccelli I, Luna E, Flors V (2025) Defense priming: an adaptive part of induced resistance. **Annual Review of Plant Biology** 76:31-59.

Messina M (2022) Perspective: soybeans can help address the caloric and protein needs of a growing global population. **Frontiers in Nutrition** 9:909464.

Molina-Montenegro MA, Oses R, Torres-Díaz C, Atala C, Zurita-Silva A, Ruiz-Lara S (2016) Root-endophytes improve the ecophysiological performance and production of an agricultural species under drought condition. **AoB Plants**8:plw062.

Morales-Vargas AT, López-Ramírez V, Álvarez-Mejía C, Vázquez-Martínez J (2024) Endophytic fungi for crops adaptation to abiotic stresses. **Microorganisms** 12:2056.

Nabity PD, Zavala JA, Delucia EH (2013) Herbivore induction of jasmonic acid and chemical defences reduce photosynthesis in *Nicotiana attenuata*. **Journal of Experimental Botany** 64:685-694.

Nahas E (1986) Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 2:81-87.

Neilands BB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry** 160:119-129.

Orozco-Mosqueda M del C, Glick BR, Santoyo G (2020) ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): an efficient mechanism to counter salt stress in crops. **Microbiological Research** 235:126439.

Ortiz-Urquiza A, Riveiro-Miranda L, Santiago-Alvarez C, Quesada-Moraga E (2010) Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology** 105:270-278.

Osugi A, Sakakibara H (2015) Q and A: how do plants respond to cytokinins and what is their importance? **BMC Biology**13:102.

Pains E, André R, Martinez De Oliveira L, Souza Filho GA, Ferreira PCG (2007) Obtenção e seleção de mutantes Tn5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal 5) com alterações na produção de auxinas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**31:1237-1245.

Pang F, Li Q, Solanki MK, Wang Z, Xing Y (2024) Soil phosphorus transformation and plant uptake driven by phosphate-solubilizing microorganisms. **Frontiers in Microbiology** 15:1324567.

Patkar RN, Naqvi NI (2017) Fungal manipulation of hormone-regulated plant defense. **PLoS Pathogens** 13:e1006334.

Peleg Z, Blumwald E (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. **Current Opinion in Plant Biology** 14:290-295.

Peng P, Li R, Chen ZH, Wang Y (2022) Stomata at the crossroad of molecular interaction between biotic and abiotic stress responses in plants. **Frontiers in Plant Science** 13:852239.

Penrose DM, Glick BR (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiologia Plantarum** 118:10-15.

Petrini O, Fisher PJ (1986) Fungal endophytes in *Salicornia perennis*. **Transactions of the British Mycological Society**87:647-651.

Pieterse CMJ, Van Der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM (2012) Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** 28:489-521.

Poorter H, Niklas KJ, Reich PB, Oleksyn J, Poot P, Mommer L (2012) Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. **New Phytologist** 193:30-50.

Poudel M, Mendes R, Costa LAS, Bueno CG, Meng Y, Folimonova SY, Garrett KA, Bonito G (2021) The role of plant-associated bacteria, fungi, and viruses in drought stress mitigation. **Frontiers in Microbiology** 12:743512.

R Core Team (2024) R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

Rehner SA, Buckley E (2005) A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia** 97:84-98.

Russo ML, Pelizza SA, Cabello MN, Stenglein SA, Scorsetti AC (2015) Endophytic colonisation of tobacco, corn, wheat and soybeans by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales). **Biocontrol Science and Technology** 25:475-480.

Russo ML, Pelizza SA, Vianna MF, Allegrucci N, Cabello MN, Toledo AV (2019) Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) Merr. growth and yield. **Journal of King Saud University – Science** 31:728-736.

Seo M, Jikumaru Y, Kamiya Y (2011) Profiling of hormones and related metabolites in seed dormancy and germination studies. In: Kermode AR (Ed.) **Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press, p. 99-111.

Singh A, Roychoudhury A (2023) Abscisic acid in plants under abiotic stress: crosstalk with major phytohormones. **Plant Cell Reports** 42:961-974.

Suebrasri T, Harada H, Jogloy S, Ekprasert J, Srinives P (2020) Auxin-producing fungal endophytes promote growth of sunchoke. **Rhizosphere** 16:100271.

Taheri P (2025) Endophytic fungi as regulators of phytohormone production: cytomolecular effects on plant growth, stress protection and importance in sustainable agriculture. **Plant Stress** 17:100345.

Tavallali V, Darvishzadeh MD (2025) Synergistic effects of Fe nanocomplex and nitrophenolate-based biostimulant on growth and physiological performance of tomato seedlings. **BMC Plant Biology** 25:112.

Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK (2012) Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. **Trends in Plant Science** 17:260-270.

Timbó RV, Hermes-Lima M, Silva LP, Guedes RNC, Oliveira EE (2014) Biochemical aspects of the soybean response to herbivory injury by the brown stink bug *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). **PLoS One** 9:e109735.

United States Department of Agriculture – Foreign Agricultural Service (2026) Production: soybean data. Washington: USDA-FAS.

Vargas-Almendra A, Ruiz-Medrano R, Núñez-Muñoz LA, Rivera-Bustamante RF, Xoconostle-Cázares B (2024) Advances in soybean genetic improvement. **Plants** 13:1987.

Verma SC, Ladha JK, Tripathi AK (2001) Evaluation of plant growth-promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology** 91:127-141.

Verma V, Ravindran P, Kumar PP (2016) Plant hormone-mediated regulation of stress responses. **BMC Plant Biology**16:86.

Villas Boas GL, Panizzi AR (1980) Biologia de *Euschistus heros* (Fabricius 1798) em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 9:105-113.

Vinciarelli F, De Vivo M, Terenzi A, Santeusanio S, Sabatini S, Frugis G (2025) Identification of a specific role of dihydrozeatin in the regulation of the cell differentiation activity in *Arabidopsis* roots. **Plants** 14:1501.

Walling LL (2000) The myriad plant responses to herbivores. **Journal of Plant Growth Regulation** 19:195-216.

Wang L, Wu J (2013) The essential role of jasmonic acid in plant-herbivore interactions: using the wild tobacco *Nicotiana attenuata* as a model. **Journal of Genetics and Genomics** 40:597-606.

Wang X, Yuan Q, He L, Li Y, Zhang Y, Liu H (2024) Biological and physiological effects in *Bemisia tabaci* feeding on tomatoes endophytically colonized by *Beauveria bassiana*. **Pest Management Science** 80:4085-4097.

Wang Y, Mostafa S, Zeng W, Jin B (2021) Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses. **International Journal of Molecular Sciences** 22:8568.

Wei QY, Li YY, Xu C, Wu YX, Zhang YR, Liu H (2020) Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* increases the resistance of tomatoes against *Bemisia tabaci*. **Arthropod-Plant Interactions** 14:289-300.

Zhang Q, Gong M, Xu X, Li J, Zhang H, Zhao Y (2022) Roles of auxin in the growth, development, and stress tolerance of horticultural plants. **Cells** 11:3584.

Zimmermann G (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology** 17:553-596.

Zrimec J, Correa S, Zagorščak M, Mahnič A, Turk V, Gruden K (2025) Evaluating plant growth–defense trade-offs by modeling the interaction between primary and secondary metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 122:e2502160122.

Zvereva EL, Lanta V, Kozlov MV (2010) Effects of sap-feeding insect herbivores on growth and reproduction of woody plants: a meta-analysis of experimental studies. **Oecologia** 163:949-960.

Zwack PJ, Rashotte AM (2015) Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. **Journal of Experimental Botany** 66:4863-4871.

Imagens complementares

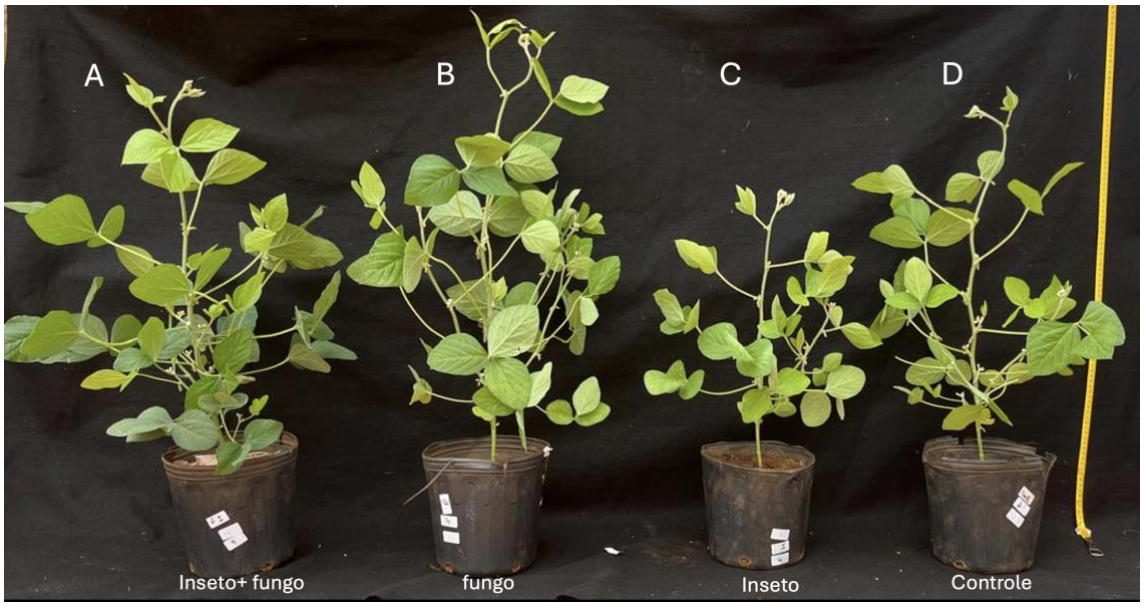


Figura complementar 1. (A) planta inoculada com *Beauveria amorpha* e infestada com *Euschistus heros.* (B) planta inoculada com *B. amorpha.* (C) Planta infestada com *E. heros*. (D) Planta controle (sem fungo e sem inseto).



Figura complementar 2. Plantas de soja infestadas com *Euschistus heros*

CAPÍTULO 4- The inoculation of *Beauveria amorpha* in soybean plants influences the attractive behavior of *Euschistus heros*

Lana Letícia Barbosa de Carvalho[1*], Gustavo Andrade Carneiro[1], Andressa de Souza Pollo[1], Ricardo Antonio Polanczyk[1]

Department of Plant Protection, School of Agricultural and Veterinary Sciences, São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal-SP, 14884-900, Brazil [1]

[*]lana.carvalho@unesp.br

ABSTRACT:

Beauveria spp. are entomopathogenic and endophytic fungi used in pest management because of their efficacy and environmental advantages over chemical pesticides. While *Beauveria bassiana* dominates the market, *Beauveria amorpha* remains unexplored despite its potential as a bioinsecticide. This study demonstrated, for the first time, the endophytic colonization of soybean by *B. amorpha* and its effects on the attractiveness of *Euschistus heros*, the most important soybean pest. To evaluate endophytic colonization, three fungal concentrations (10^7, 10^8, and 10^9 conidia/mL) were inoculated into seeds (immersion), roots (soil drench), leaves (spraying), and seeds + leaves (immersion + spraying). Olfactory responses were assessed using a Y-tube olfactometer, and plant colonization was confirmed using a selective culture medium. Both analyses were performed at 7, 14, and 21 days after fungal inoculation. Endophytic colonization by *B. amorpha* was confirmed by re-isolation from different plant tissues and was associated with changes in plant attractiveness. Seed inoculation produced the strongest repellency effect against *E. heros*, and increased fungal concentration did not result in greater repellency. High fungal concentrations and double inoculation (leaf + seed) reduced the repellency effect and, in some cases, increased plant attractiveness. Moreover, attractiveness varied according to time, inoculated tissue, and fungal concentration, with stronger behavioral responses and colonization occurring during the first days after inoculation. Endophytic colonization by *B. amorpha* altered soybean attractiveness to *E. heros*, with seed inoculation producing the most consistent repellency responses.

Keywords: Neotropical brown stink bug, entomopathogenic fungus, endophytism, Plant volatiles, biological control.

---

3 Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Scientific Report e encontra-se em avaliação por pares para publicação

Introduction

The genus *Beauveria* (Hypocreales: Ascomycota) comprises filamentous entomopathogenic fungi with a cosmopolitan distribution, widely found in soil, and associated with various insects (Clifton et al., 2023; Zimmermann, 2007). Traditionally, species from this genus have been used in agricultural pest control through spraying, where conidia adhere to the insect integument, penetrate the cuticle and hemocoel, colonize internal tissues and organs, and ultimately cause host death [3].Owing to these characteristics, the use of fungi from the *Beauveria* genus in agriculture represents an alternative to face the challenges of achieving more sustainable production from both economic and environmental perspectives.

Currently, the global consumption of chemical pesticides is estimated to be 2.7 million tons annually (Daraban et al., 2023; Sharma et al., 2020). This model leads to problems such as environmental contamination, impacts on natural enemies, risks to human health, and the selection of resistant populations (Lucini et al., 2021; E. S. Souza et al., 2017). One example is the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (Fabricius, 1798), the main pest of soybeans in the Neotropical region [9], whose management still relies mostly on chemical insecticides (Bueno et al., 2013). Reports of resistance evolution and consequent reduction in the efficacy of products have become increasingly frequent (Guedes, 2017; Tuelher et al., 2018). Furthermore, the development of a new chemically active ingredient can cost between US$ 250 and 300 million, take up to 16 years to reach the market, and have an average lifespan of only 3 to 5 years (McDougall, 2016; OECD, 2021). In contrast, biological products based on entomopathogenic microorganisms require significantly lower investments, approximately US$ 3 to 10 million (IBMA -INTERNATIONAL BIOCONTROL MANUFACTURERS., 2024), and offer additional advantages, such as greater selectivity, specificity, and slower evolution of resistance (Lacey et al., 2015).

One of the most important constraints of bioinsecticides adoption is the low persistence under adverse environmental conditions, which are quite common in Brazilian agriculture, such as high temperatures and low relative humidity (Dannon et al., 2020). In addition to infecting insects, *Beauveria* species can establish endophytic associations (Mantzoukas & Eliopoulos, 2020b). By colonizing plant tissues, the fungus gains protection from environmental effects and can also induce resistance mechanisms, providing protection to the host plant and promoting growth (Hu & Bidochka, 2021b; Vega et al., 2008). In this context, the use of *Beauveria* an endophytic emerges as a promising alternative for the management of insect pests(Aravinthraju et al., 2024; L. Liu et al., 2025; Mwamburi, 2021).

Within the *Beauveria* genus, the most widely used species in biological control is *Beauveria bassiana (Mascarin et al., 2019)*. However, species as *Beauveria amorpha*, remains poorly explored, although there are records of their occurrence associated with soils, plants, and pest arthropods, highlighting their potential for pest management (Campos et al., 2005; D. A. de Souza et al., 2020). All commercial products registered based on *Beauveria* in Brazil use *B. bassiana* as an active ingredient (MAPA. Ministry of Agriculture and Livestock. AGROFIT –, 2025; Mascarin et al., 2019). It must be considered that reliance on a single species reduces the ecological resilience of agricultural systems and may compromise the long-term effectiveness of biocontrol. This scenario underscores the ecological and technological need to expand the investigation and use of other *Beauveria* species, such as *B. amorpha*, which may represent promising

alternatives as biocontrol agents, either through direct application by spraying or endophytic use in the future. Endophytic *Beauveria* species may provide additional benefits, such as altering plant physiology and volatile profiles emitted by plants (Aravinthraju et al., 2024; González-Mas et al., 2021). These volatile organic compounds (VOCs) play a central role in insect management, as they affect the feeding behavior, oviposition, and attractiveness of different species (Farrokhzadeh et al., 2025; González-Mas et al., 2019). This is the reason that many phytophagous insects use VOCs as olfactory cues to locate host and non-host plants (Bruce & Pickett, 2011; Ramírez-Ordorica et al., 2022, 2024).

The effectiveness of endophytic colonization by *Beauveria* species depends on multiple factors, including the inoculation method, plant part colonized, and concentration of the inoculum (Farrokhzadeh et al., 2025; Qin et al., 2021; X. Wang et al., 2024). Furthermore, colonization can be temporary and may vary between plant tissues and species (Gurulingappa et al., 2010a; X. Wang et al., 2024). Despite these advances, studies that comprehensively evaluate how these factors influence the behavioral responses of piercing-sucking insects to plants colonized by entomopathogenic fungi are scarce. There is a gap in the exploration of *B. amorpha*, both in terms of its colonization capacity and potential impact on pest management. Thus, this study aimed to investigate the effects of inoculating soybean tissues with different concentrations of B. amorpha, assessing the attractiveness of adult *E. heros* females and the efficiency of fungal colonization in different tissues. It is important to highlight that this study is innovative, as there are no previous records in the literature specifically proving that this fungus is endophytic or that it directly influences insect behavior. Therefore, by addressing a neglected *Beauveria* species from the perspective of multitrophic ecology, this study advances our understanding of the mechanisms by which endophytic fungi modulate plant-insect interactions.

Results

Identification of the *Beauveria amorpha* fungal isolate

According to the Bayesian phylogenetic analysis of the concatenated sequences of the ITS region and RPB1 gene, isolate UFSM-01 was identified as belonging to the species *Beauveria amorpha* (Fig. 1). A comparison of the isolate sequences with those available in the database revealed a 99.63% identity for the ITS region (558 bp) and 99.43% identity for the RPB1 gene (750 bp), supporting the proposed molecular identification.

Olfactory responses of *Euschistus heros* to plants inoculated with *Beauveria amorpha*

The olfactory responses of *E. heros* in Y-tube olfactometer bioassays showed that inoculation method, fungal concentration, and time after inoculation influenced insect

behavior. Non-inoculated plants (control) were preferred in most treatments, particularly in assessments at 7 and 14 days after inoculation with 10^7 and 10^8 conidia/mL (Fig. 1).

Inoculation of seeds (S) with *B. amorpha* (Fig. 2a) significantly influenced the olfactory response of *E. heros* at different concentrations and evaluation times. In eight treatments (89%), a significant preference ($p < 0.01$) was observed for the control plants, indicating that seed inoculation was the most effective method. The concentrations of 10^7 and 10^8 conidia/mL showed the most consistent responses, with a preference for control plants exceeding 80% across all evaluation times. Only one treatment (10^9 conidia/mL at 21 days) did not differ from the other treatments.

E. heros also showed a preference for control plants at most concentrations evaluated with root inoculation (R) via soil drench (Fig. 2b). Five treatments (55%) showed strong differences ($p < 0.01$), whereas two (22%) showed moderate differences ($p < 0.05$). concentrations of 10^7 and 10^8 conidia/mL resulted in consistent responses across all evaluation times. In contrast, the concentration of 10^9 conidia/mL did not result in differences at 7 and 21 d after inoculation.

Foliar inoculation (L) of *B. amorpha* (Fig. 2c) had no effect on the attractiveness of *E. heros*, with most treatments showing similar responses between the treated and control plants. No clear differences ($p > 0.05$) were observed in five of the nine treatments (56 %). Although differences were detected mainly at lower concentrations and earlier evaluation times, these responses were less consistent than those of seed and root inoculation methods.

The combined treatment involving seed inoculation followed by foliar application (SL) of *B. amorpha* showed variable responses (Fig. 2d). Five treatments (56%) showed strong evidence of differences ($p < 0.01$), whereas four (44%) showed no clear differences. At a concentration of 10^7 conidia/mL, a consistent preference for control plants (>80%) was observed across all evaluation times. At 10^8 conidia/mL, only the 7-day evaluation showed a difference between the treatments. At 10^9 conidia/mL, most treatments did not differ, except at 7 days, where insects showed a preference for the treated plants.

The heatmap (Fig. 3) summarizes the behavioral responses of *E. heros* across all treatments, integrating the effects of the inoculation method, fungal concentration, and time after inoculation. Seed inoculation (S) showed the highest frequency of contrasting responses, with a predominance of stronger color intensity, indicating the repellence of inoculated plants. Root inoculation (R) also resulted in consistent responses, although they were less frequent and less intense than those observed for S. In contrast, foliar inoculation (L) showed the weakest effects, with a predominance of responses without any clear differences.

Evaluation of *Beauveria amorpha* Inoculation in Soybean Plants

All inoculation techniques were effective in colonizing *soybean plants with B. amorpha*. No fungal growth was observed in the control group (data not shown). The results of the ANOVA comparing inoculation techniques, plant organs, and time are presented in Tables 1–4.

Fungal inoculation via seeds (Table 1) resulted in endophytic colonization with low efficiency and persistence, which varied according to the concentration applied and the plant tissue. Concentrations of 10^8 and 10^9 conidia/mL yielded the highest colonization rates, particularly 7 days after inoculation. The stem showed the highest

colonization, reaching up to 40%, followed by the root (20%), indicating limited translocation of the fungus from the seed to the stem. Colonization of leaves remained low, not exceeding 10%, even at higher concentrations. In pods, colonization was observed mainly at higher concentrations, with values of approximately 20% maintained up to 21 days. Despite some persistence in the roots and pods, colonization decreased over time in all tissues.

Root inoculation via soil drenching (Table 2) resulted in higher colonization levels, particularly in root tissues and at higher concentrations. The concentration of 10^9 conidia/mL showed the highest root colonization, reaching 70% at 7 days after inoculation, followed by a decline to 25% at 14 days and 15% at 21 days. In the stem, colonization was observed mainly at concentrations of 10^8 and 10^9 conidia/mL, with values reaching 50% by 14 days. Colonization of leaves, stems, and pods also occurred, although less frequently and with greater variability, suggesting predominantly localized colonization. Despite the reduction over time, this method showed more stable colonization than the others.

Foliar inoculation (Table 3) was also effective, resulting in colonization across all plant tissues, particularly in the leaves. The highest colonization levels were observed in leaves at 7 days after inoculation, with 60%, 70%, and 80% for concentrations of 10^7, 10^8, and 10^9 conidia/mL, respectively. However, colonization has declined over time. At 14 days, leaf colonization decreased to 20%, 35%, and 35%, and at 21 days, it decreased to 10%, 15%, and 15% for the same concentrations. In other tissues (pod, stem, and root), colonization was lower, with maximum values ranging from 30 to 45%, depending on the concentration and time.

Combined inoculation of seeds and leaves (Table 4) resulted in the highest levels of endophytic colonization among all the treatments. Leaves showed consistently high colonization at all concentrations tested (10^7, 10^8, and 10^9 conidia/mL), particularly at 7 days after inoculation. Colonization was also observed in the roots and pods. Among all treatments, a concentration of 10^9 conidia/mL resulted in the highest colonization across plant tissues, with pod, stem, and root colonization frequently exceeding 50%. As observed with other methods, colonization decreased over time.

Discussion

We first demonstrated that *the behavior of Euschistus heros* is influenced by soybean plants endophytically colonized by *Beauveria amorpha*. Similar effects have been reported for *B. bassiana*, whose endophytic colonization alters plant volatile profiles and, consequently, herbivore attraction (Geedi et al., 2023; George et al., 2024). This modulation is likely associated with the recognition of conserved fungal structures, such as chitin and β-glucans, by plant pattern recognition receptors (Eleftherianos et al., 2013; Ownley et al., 2008), triggering systemic defense responses. These responses can alter hormonal balance and volatile organic compound (VOC) emission, ultimately affecting insect behavior (González-Mas et al., 2021).

Inoculation of soybean plants with *B. amorpha* via seeds (S) was the most effective method for inducing *E. heros* no preference when different concentrations and times were compared. This response may be associated with the early colonization of vascular tissues and early activation of induced systemic resistance (ISR) defenses **[39,40].** Infection starting from the seeds may promote a plant "immune memory,"

keeping the plant metabolically prepared to respond to subsequent stresses **(Yang et al., 2022)**. This condition involves the coordinated activation of the jasmonate and ethylene hormone pathways (Rivera et al., 2017), which regulate the production of volatile secondary metabolites, such as terpenes and flavonoids (Luan et al., 2013; Martorana et al., 2017; Shepherd & Wagner, 2007), which are associated with insect repellency and interference with oviposition preferences (Su et al., 2018). This dynamic may explain the lower preference for reproductive-age female *E. heros* in seed-inoculated vs. non-inoculated plants.

The concentration of 10^9 conidia/mL showed inconsistent performance in behavioral modulation, with no significant preference across all inoculation methods and a negative effect in the combined leaf + seed treatment, in which *E. heros* showed greater attraction to the treated plants. This pattern suggests that excessive inoculum doses may exceed the plant physiological threshold for tolerance to endophytic colonization by these fungi. In contrast to moderate concentrations, which induce resistance and promote defensive homeostasis, very high levels of *Beauveria* may be perceived as pathogenic, triggering stress responses, the production of reactive oxygen species (ROS), accumulation of phenolics, and tissue lignification (Mageroy et al., 2020; Moisan et al., 2020; Patkar & Naqvi, 2017; Tao et al., 2016). These processes alter the balance among the jasmonate, ethylene, and salicylic acid pathways, resulting in oxidative stress and reduced metabolic efficiency (Moisan et al., 2020; Tao et al., 2016). Moreover, over-inoculation may destabilize the native endophytic microbiota and induce the emission of non-defensive volatiles, making the plants more attractive to herbivores, as observed in the leaf + seed treatment with 10^9 conidia/mL. The negative effects associated with double inoculation (leaf + seed) reinforce this interpretation. Simultaneous fungal entry through different tissues may cause overlap or conflict in signaling between the jasmonic acid and salicylic acid pathways, which are known to exhibit functional antagonism (Patkar & Naqvi, 2017; Tao et al., 2016). This cross-signaling compromises the coordination of defenses and increases the energetic cost of metabolism, reducing the stability of fungal colonization and the efficiency of the systemic response.

Data on the re-isolation of the fungus from different plant parts revealed that *B. amorpha* was detected in roots, stems, leaves, and pods. This is because fungi can infect different plant parts (George et al., 2024). However, the persistence of fungi decreased over time, consistent with previous observations (Russo et al., 2015a, 2019). This result is compatible with the natural dynamics of endophytic colonization, in which the presence of the microorganism is often transitory and is limited by factors such as competition with the native microbiota, the plant's physical-chemical barriers, and plant autophagy mechanisms (Russo et al., 2019; Wei et al., 2020a).Therefore, even with more frequent colonization confirmed seven days after *B. amorpha* inoculation, fungal activity may cease before the end of 21 days.

No direct relationship was observed between the presence of *B. amorpha* and the behavioral response of *E. heros*, indicating that active colonization is not a necessary condition for repellency. Although the leaf and leaf + seed methods promoted the highest colonization rates, they were less effective in modulating behavior, whereas seed and root inoculations, which resulted in more moderate colonization, led to more consistent responses in the plants. This pattern reinforces the hypothesis that the observed effect arises from an initial systemic response to the fungus, consistent with the concept of immunological priming, in which initial contact with the microorganism induces a prolonged state of alertness, even after colonization has declined (Mauch-Mani et al., 2025; Tiwari et al., 2022; Yang et al., 2022).

However, despite the positive laboratory results showing non-preference of female *E. heros* for soybean plants inoculated with *B. amorpha*, under field conditions insects may still accept suboptimal hosts despite initial aversion (Smaniotto & Panizzi, 2015). Given the polyphagous nature of *E. heros*, individuals may migrate to alternative hosts, such as cotton, common bean, sunflower, maize, or even weeds that serve as temporary resources. This may result in the redistribution of individuals across the agricultural landscape rather than the complete rejection of treated plants.

Thus, endophytic entomopathogenic fungi may reduce the initial colonization pressure but may not completely prevent herbivory. From an applied perspective, spatial arrangements combining treated and untreated plants or alternative hosts could be explored to influence insect movement, analogous to push–pull strategies and other spatially structured approaches used in integrated pest management, including refuge-based systems (Obermayr et al., 2015; Tabashnik et al., 2008)

Accurate taxonomic identification of fungal isolates is essential for interpreting ecological results. Phylogenetic analysis based on concatenated gene sequences confirmed that the isolate belonged to *Beauveria amorpha*, increasing confidence in the biological interpretations. The use of multiple molecular markers is critical, as single-locus identification may lead to misclassification, particularly in genera with high genetic similarity, such as *Beauveria* (Manfrino et al., 2024; Y. Wang et al., 2022).

Finally, *B. amorpha* emerged as a relevant species in this study. Although there are few reports of this fungus being isolated from soil, plants, and pest arthropods (MAPA. Ministry of Agriculture and Livestock. AGROFIT –, 2025; Mascarin et al., 2019), its ecological role and endophytic potential remain largely unexplored. The results presented here indicate that *B. amorpha* can modulate plant–insect interactions in a manner comparable to *B. bassiana*, suggesting that functional endophytism is more widespread within the genus *Beauveria* than previously thought to be. Diversifying the species explored as biocontrol agents can reduce the dependence on *B. bassiana* in commercial products of the *Beauveria* genus and broaden both the functional spectrum and ecological resilience of agricultural systems. Furthermore, the use of entomopathogenic fungi with endophytic capacity in agriculture aligns with the United Nations Sustainable Development Goals (SDGs) and Environmental, Social, and Governance (ESG) guidelines, as it contributes to more sustainable agricultural practices, including reduced water consumption, an increasingly limited and finite resource.

Methods

Establishment and rearing of *Euschistus heros* in the laboratory

The insects were obtained from the Microbial Control of Pest Arthropods Laboratory (LCMAP), FCAV/UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brazil. The colony was established in May 2022 with 100 adults, and additional individuals were introduced in 2023 and 2024 to maintain the population vigor.

The insects were maintained in plastic containers covered with voile fabric to prevent their escape and allow ventilation. The diet consisted of bean pods (*Phaseolus vulgaris*) and peanuts (*Arachis hypogaea*), and water was provided using cotton wads soaked in deionized water. Pieces of raw cotton fabric were placed on the inner sides of the containers to serve as oviposition substrates for the females. Insects were maintained and

handled twice per week under controlled environmental conditions: temperature of 26 ± 1 °C, relative humidity of 70 ± 10%, and photoperiod of 14 h light:10 h dark.

Selection and identification of the fungal isolate of *Beauveria amorpha*

The *Beauveria* fungus used in this study was previously selected for the control of *E. heros* and was initially identified as *Beauveria bassiana* [38]. However, the isolate underwent molecular identification and was subsequently reclassified as *Beauveria amorpha*. For this purpose, the isolate was cultured in Potato Dextrose (PD) liquid medium and incubated for seven days in a B.O.D. incubator at 27 ± 1 °C. After the incubation period, the mycelial mass was sieved, washed with ultrapure water, and dried in an oven at 50 °C for 12 h. The mycelium was then ground in liquid nitrogen until a fine powder was obtained, from which 0.1 g was transferred to 2.0 mL microtubes. DNA extraction was performed according to the protocol described by (Eurya Kuramae-Izioka, 1997).

For sequencing, the ITS1-5.8S-ITS4 region and the RPB1 gene (RNA Polymerase II Largest Subunit) were amplified. Amplification of the ITS region was performed using the oligonucleotides ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') and ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White et al., 1990) generating a fragment of approximately 650 bp. For the RPB1 gene, the oligonucleotides RPB1Af (5'-GAR TGY CCD GGD CAY TTY GG-3') and RPB1Cr (5'-CCN GCD ATN TCR TTR TCC ATR TA-3') (Stiller & Hall, 1997), were used, generating a fragment of approximately 1000 bp. The amplification reactions consisted of 1X buffer (50 mM KCl, 200 mM TRIS-HCl, pH 8.4), 2 mM MgCl2, 0.2 mM dNTPs, 0.5 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen), 2.5 pmol of each primer, 60 ng genomic DNA, and sterile pure water to a total volume of 20 µL. Amplification was performed in a Nexus thermal cycler (Eppendorf) programmed for one cycle at 95°C for 2 min and 30 s, 35 cycles at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 40 s, followed by a final cycle at 72°C for 10 min.

Sequencing reactions were performed using the BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems) and capillary electrophoresis sequencing on an ABI3730 sequencer (Applied Biosystems). The generated electropherograms were processed using the Phred/Phrap/Consed software suite (Ewing & Green, 1998; Gordon et al., n.d.; Green, 1996) to verify the base quality and trim the sequence with a Phred quality score equal to or greater than 20. The qualified sequences were compared to other sequences deposited in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database using the BLAST tool (Altschup et al., 1990).

To obtain the phylogenetic tree, the sequences from each gene region, ITS and RPB1, of the study isolate and additional type species sequences from the NCBI database were aligned separately using the MUSCLE tool (Edgar, 2004) and then concatenated for phylogenetic analysis, which was carried out using the evolutionary model selected

according to the Akaike Information Criterion (AIC) with the ModelTest 3.7 tool [(Posada & Buckley, 2004; Posada & Crandall, 1998), using Bayesian analysis with the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algorithm implemented in the MrBayes 3.2.3 software (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). The evolutionary model used corresponded to substitution type 6 and a gamma (γ) distribution. Analyses were performed in four chains with 2,000,000 generations, and trees were sampled every 100 generations. At the end of the analyses, once a standard deviation below 0.01 was obtained, 25% of the initially generated trees were removed. The resulting phylogram was graphically edited using Dendroscope 3 (Huson & Scornavacca, 2012).

Implementation of the experiment at greenhouse

The experiment was conducted in the greenhouse of LCMAP, São Paulo State University (UNESP/FCAV), Jaboticabal, SP, Brazil. Soybean seeds of the cultivar BRS 544 RR were provided by EMBRAPA Soja (Brazilian Agricultural Research Corporation, Londrina, PR, Brazil). Prior to the experiment, seeds were surface-sterilized with 70% ethanol for 1 min, followed by 6% sodium hypochlorite for 30 s, rinsed three times with sterile distilled water, and dried on sterile filter paper inside a laminar flow cabinet.

The experiment consisted of 12 treatments, comprising three concentrations of *B. amorpha* (10^7, 10^8, and 10^9 conidia/mL) combined with four inoculation methods: seed (S), root (R), leaf (L), and seed followed by foliar reinoculation (SL), and a negative control (plants without fungal inoculation). Each treatment consisted of six plants per pot.

Seed inoculation (S) and seed followed by foliar reinoculation (SL) were performed as described by Russo et al. (2015, 2019), with modifications. Soybean seeds were immersed for 2 h in conidial suspensions at the respective concentrations. For the remaining treatments and the control, seeds were immersed in sterile deionized water containing 0.005% Tween. After treatment, seeds were removed from the solutions and sown in germination trays containing autoclaved substrate (BIOMIX®), which was sterilized three times at 120 °C for 20 min to ensure aseptic conditions and uniform seedling development.

When seedlings reached the V1 stage, they were transplanted into 5 L pots containing a mixture of sand, cattle manure, and red Latosol (1:1:2). The soil mixture was autoclaved at 120 °C for 40 min, and its fertility was adjusted according to the recommendations of Bulletin 100 (Agronomic Institute of Campinas, Brazil).

The remaining treatments were applied when the plants reached the V4–V5 growth stages. For root inoculation (R), 8 mL of fungal suspension was applied to the soil near the root system using a syringe (soil drench method). For leaf inoculation (L) and seed followed by foliar reinoculation (SL), 8 mL of the respective fungal suspensions were applied to the aerial parts of the plants using a manual sprayer to ensure complete coverage.

Olfactory responses of *Euschistus heros* **to plants inoculated with** *Beauveria amorpha*

Olfactory analyses of *E. heros* using Y-tube olfactometer bioassays were conducted 7, 14, and 21 d after treatment application. The Y-tube used for the olfactometer had an internal diameter of 2.5 cm, stem length of 11 cm, and arms of 12 cm, with a 45º angle between them. The Y-tube was placed horizontally on a bench covered with light brown kraft paper. The plants were placed in glass vessels with a height of 50 cm and an internal diameter of 15 cm, into which air filtered through activated charcoal was introduced. The vessels were connected to the olfactometer with Teflon (PTFE) tubes that transported the odor to the bioassay arena at a rate of 300 µL/min/arm. The experiment and olfactometer regulations were performed as described in previous studies (DeVries et al., 2019; Roberts et al., 2023).

The plants from the 12 treatments, consisting of three fungal concentrations (10^7, 10^8, and 10^9 conidia/mL) and four inoculation methods (S, R, L, and SL), were evaluated in a Y-tube olfactometer for their attractiveness or repellency relative to non-colonized control plants. For each treatment and evaluation period (7, 14, and 21 days after inoculation), two independent soybean plants were assessed, using 30 reproductive-age female *E. heros* per plant, totaling 60 insects per treatment at each evaluation period. For the olfactometer experiment, the soil was carefully removed from the roots of the soybean plants, and the plants were washed with water to eliminate any soil residue. After completely removing the soil, the roots were placed on a tuft of cotton soaked in sterile distilled water to ensure the necessary moisture content. To prevent water from dripping, the roots and moist cotton were wrapped in aluminum foil to create a seal to maintain plant hydration.

In the olfactometry bioassays, adult insects were kept without food for one hour and subjected to individual tests, being transferred to the olfactometer. The choice response of *E. heros* to plant odors was considered when the insect moved against the airflow and reached the end of one of the y-arms. In each evaluation, an inoculated and a control plant were placed in glass tubes connected to the double ends of a Y-tube. Each insect was released at the individual entrance of the Y-tube, where it had the opportunity to choose between a colonized and non-colonized (control) plant. After every five insects were evaluated, the order of the plants was alternated within the chambers, and the olfactometer was cleaned with 96° GL ethyl alcohol. The visual assessments consisted of a one-minute period for each insect (a time determined by pre-tests). Insects that did not respond within this time interval were marked as non-responsive and excluded from the analysis. Each insect was tested only once to avoid pseudoreplication.

Fungal inoculation assessment

After olfactometer bioassays, a destructive sampling method was applied to soybean plants, both inoculated and non-inoculated with *B. amorpha*, to confirm fungal colonization. In this study, we evaluated the persistence of fungal colonization and its distribution across different plant tissues. The 12 treatments (three concentration-10^7, 10^8, and 10^9 conidia/mL combined with four inoculation methods: seed (S), root (R), leaf (L), and seed followed by foliar reinoculation (SL), plus a control) were evaluated at 7, 14, and 21 days after inoculation. Four plant tissues were analyzed for each plant: roots, stems, leaves, and pods. Plant tissues were surface-sterilized by immersion in 70% ethanol for 2 min, followed by sodium hypochlorite for 1 min, and rinsed three times with sterile, distilled water.

For this procedure, a previously described method (Russo et al. 2019) was used with some adaptations. Inside a laminar flow chamber, each plant organ was cut into 1 cm^2 pieces using previously sterilized scissors. Five fragments from each plant organ were placed in duplicate on Petri dishes containing CTC medium (yeast extract, potato, dextrose, agar, chloramphenicol, cycloheximide, and tetracycline).

To verify the effectiveness of surface sterilization, 100 µL of the final rinse water from each sample was plated on Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA). All plates were maintained at 26 °C in a climate-controlled growth chamber (B.O.D.). Fungal growth was evaluated after 10–15 d of incubation. Emerging colonies were examined microscopically to confirm the identity of the isolates. Data were expressed as colonization frequency (CF) = (number of colonized plant pieces / total number of plant pieces examined) × 100 (Petrini & Fisher, 1986).

Statistical analysis

The olfactory choices of *Euschistus heros* were analyzed using a chi-square (χ^2) goodness-of-fit test ($p < 0.05$) to compare the observed frequencies of selection between the inoculated and control plants. Only responsive insects were included in this study.

Analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test ($p < 0.05$), was used to compare the mean colonization among tissues, concentrations, and days for each inoculation method. Data were processed using the R software (R Core Team, 2024), with the ExpDes package.

Molecular identification of the fungal isolate was based on sequence data from the ITS and RPB1 regions. Sequences were quality-checked and compared with reference sequences available in the NCBI database for taxonomic confirmation of the species. Phylogenetic relationships were inferred using a Bayesian approach based on concatenated sequences, as recommended for *Beauveria [71,77,78]*.

Acknowledgements

The first author acknowledges CAPES for the doctoral scholarship.

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Finance Code 001.

Author Contributions

L.L.B.C. conceived and designed the study, conducted the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. G.A.C. assisted with the experimental setup and evaluations. A.S.P. performed the molecular identification of the fungal species. R.A.P. supervised the study, contributed to data interpretation, and critically revised the manuscript. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Data Availability

The datasets generated during this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Competing Interests

The authors declare no competing interests.

References

1. Zimmermann, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci. Technol.* **17**, 553–596 (2007).
2. Clifton, E. H., Castrillo, L. A., Jaronski, S. T. & Hajek, A. E. Cryptic diversity and virulence of *Beauveria bassiana*recovered from *Lycorma delicatula* (spotted lanternfly) in eastern Pennsylvania. *Front. Insect Sci.* **3**, 1270870 (2023).

3. Ma, M. *et al.* A life-and-death struggle: interaction of insects with entomopathogenic fungi across various infection stages. *Front. Immunol.* **14**, 1329843 (2023).
4. Daraban, G. M., Hlihor, R. M. & Suteu, D. Pesticides vs. biopesticides: from pest management to toxicity and impacts on the environment and human health. *Toxics* **11**, 983 (2023).
5. Sharma, A. *et al.* Global trends in pesticides: a looming threat and viable alternatives. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **201**, 110812 (2020).
6. Lucini, T., Panizzi, A. R. & Bueno, A. de F. Evaluating resistance of the soybean block technology cultivars to the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). *J. Insect Physiol.* **131**, 104240 (2021).
7. Souza, E. S. *et al.* Variable levels of resistance of soybean genotypes on the performance of *Euschistus heros*(Hemiptera: Pentatomidae). *J. Econ. Entomol.* **110**, 2672–2678 (2017).
8. Bueno, A. F., Paula-Moraes, S. V., Gazzoni, D. L. & Pomari, A. F. Economic thresholds in soybean-integrated pest management: old concepts, current adoption, and adequacy. *Neotrop. Entomol.* **42**, 439–447 (2013).
9. Guedes, R. N. C. Insecticide resistance, control failure likelihood and the First Law of Geography. *Pest Manag. Sci.***73**, 479–484 (2017).
10. Tuelher, E. S. *et al.* Area-wide spatial survey of the likelihood of insecticide control failure in the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. *J. Pest Sci.* **91**, 849–859 (2018).
11. McDougall, P. *The Cost of New Agrochemical Product Discovery, Development and Registration*. CropLife International (2016).
12. OECD. *Pharmaceutical Research and Development: Innovation and Access to Medicines*. OECD Health Policy Studies (OECD Publishing, 2021).
13. IBMA–International Biocontrol Manufacturers Association. Bacterial pesticides: beating the incumbents. *New Food Finance* (2024).
14. Lacey, L. A. *et al.* Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *J. Invertebr. Pathol.* **132**, 1–41 (2015).
15. Dannon, H. F. *et al.* Toward the efficient use of *Beauveria bassiana* in integrated cotton insect pest management. *J. Cotton Res.* **3**, 24 (2020).
16. Mantzoukas, S. & Eliopoulos, P. A. Endophytic entomopathogenic fungi: a valuable biological control tool against plant pests. *Appl. Sci.* **10**, 360 (2020).
17. Hu, S. & Bidochka, M. J. Root colonization by endophytic insect-pathogenic fungi. *J. Appl. Microbiol.* **130**, 570–581 (2021).
18. Vega, F. E. *et al.* Entomopathogenic fungal endophytes. *Biol. Control* **46**, 72–82 (2008).
19. Liu, L. *et al.* Evaluating *Beauveria bassiana* strains for insect pest control and endophytic colonization in wheat. *Insects* **16**, 132 (2025).
20. Aravinthraju, K. *et al.* Endophytic entomopathogenic fungi: their role in enhancing plant resistance, managing insect pests, and synergy with management routines. *J. Fungi* **10**, 865 (2024).
21. Mwamburi, L. A. Endophytic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, confer control of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), in two tomato varieties. *Egypt. J. Biol. Pest Control* **31**, 148 (2021).
22. Mascarin, G. M. *et al.* Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *J. Invertebr. Pathol.* **165**, 46–53 (2019).

23. de Souza, D. A., Lopes, R. B., Humber, R. & Faria, M. Assessment of the diversity of Brazilian entomopathogenic fungi in the genus *Beauveria*. *J. Invertebr. Pathol.* **171**, 107344 (2020).
24. Campos, R. A. *et al. Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Curr. Microbiol.* **50**, 257–261 (2005).
25. MAPA. *AGROFIT – Pesticide Registration System in Brazil*. Ministry of Agriculture and Livestock (2025).
26. González-Mas, N. *et al.* Endophytic colonization by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* affects plant volatile emissions in the presence or absence of chewing and sap-sucking insects. *Front. Plant Sci.* **12**, 660460 (2021).
27. Farrokhzadeh, H., Jaronski, S. T. & Rashed, A. Reduced survivorship, host preference, and feeding damage by *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton plants colonized by the endophyte *Beauveria bassiana*(Ascomycota: Hypocreales). *J. Econ. Entomol.* **118**, 523–530 (2025).
28. González-Mas, N., Sánchez-Ortiz, A., Valverde-García, P. & Quesada-Moraga, E. Effects of endophytic entomopathogenic ascomycetes on the life-history traits of *Aphis gossypii* Glover and its interactions with melon plants. *Insects* **10**, 165 (2019).
29. Bruce, T. J. A. & Pickett, J. A. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects – finding the right mix. *Phytochemistry* **72**, 1605–1611 (2011).
30. Ramírez-Ordorica, A., Adame-Garnica, S. G., Ramos-Aboites, H. E., Winkler, R. & Macías-Rodríguez, L. Volatile semiochemicals emitted by *Beauveria bassiana* modulate larval feeding behavior and food choice preference in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Fungi* **10**, 506 (2024).
31. Ramírez-Ordorica, A. *et al.* Volatiles released by *Beauveria bassiana* induce oviposition behavior in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *FEMS Microbiol. Ecol.* **98**, fiac083 (2022).
32. Qin, X. *et al.* Pest management via endophytic colonization of tobacco seedlings by the insect fungal pathogen *Beauveria bassiana*. *Pest Manag. Sci.* **77**, 2007–2018 (2021).
33. Wang, X. *et al.* Biological and physiological effects in *Bemisia tabaci* feeding on tomatoes endophytically colonized by *Beauveria bassiana*. *Pest Manag. Sci.* **80**, 4085–4097 (2024).
34. Gurulingappa, P., Sword, G. A., Murdoch, G. & McGee, P. A. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when *in planta*. *Biol. Control* **55**, 34–41 (2010).
35. George, J., Glover, J. P., Perera, O. P. & Reddy, G. V. P. Role of endophytic entomopathogenic fungi in mediating host selection, biology, behavior, and management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Plants* **13**, 1169 (2024).
36. Geedi, R., Canas, L., Reding, M. E. & Ranger, C. M. Attraction of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) to volatiles emitted from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Environ. Entomol.* **52**, 31–38 (2023).
37. Ownley, B. H. *et al. Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *J. Invertebr. Pathol.* **98**, 267–270 (2008).
38. Eleftherianos, L., Atri, J., Accetta, J. & Castillo, J. C. Endosymbiotic bacteria in insects: guardians of the immune system? *Front. Physiol.* **4**, 46 (2013).
39. Hönig, M., Roeber, V. M., Schmülling, T. & Cortleven, A. Chemical priming of plant defense responses to pathogen attacks. *Front. Plant Sci.* **14**, 1146577 (2023).

40. Conrath, U., Beckers, G. J. M., Langenbach, C. J. G. & Jaskiewicz, M. R. Priming for enhanced defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* **53**, 97–119 (2015).
41. Yang, Z., Zhi, P. & Chang, C. Priming seeds for the future: plant immune memory and application in crop protection. *Front. Plant Sci.* **13**, 961840 (2022).
42. Rivera, M. J., Pelz-Stelinski, K. S., Martini, X. & Stelinski, L. L. Bacterial phytopathogen infection disrupts belowground plant indirect defense mediated by tritrophic cascade. *Ecol. Evol.* **7**, 4844–4854 (2017).
43. Luan, J. B. *et al.* Suppression of terpenoid synthesis in plants by a virus promotes its mutualism with vectors. *Ecol. Lett.* **16**, 390–398 (2013).
44. Shepherd, R. W. & Wagner, G. J. Phylloplane proteins: emerging defenses at the aerial frontline? *Trends Plant Sci.***12**, 51–56 (2007).
45. Martorana, L. *et al.* An invasive insect herbivore disrupts plant volatile-mediated tritrophic signalling. *J. Pest Sci.***90**, 1079–1085 (2017).
46. Su, Q. *et al.* Whitefly aggregation on tomato is mediated by feeding-induced changes in plant metabolites that influence the behaviour and performance of conspecifics. *Funct. Ecol.* **32**, 1180–1193 (2018).
47. Tao, L., Ahmad, A., de Roode, J. C. & Hunter, M. D. Arbuscular mycorrhizal fungi affect plant tolerance and chemical defences to herbivory through different mechanisms. *J. Ecol.* **104**, 561–571 (2016).
48. Patkar, R. N. & Naqvi, N. I. Fungal manipulation of hormone-regulated plant defense. *PLoS Pathog.* **13**, e1006334 (2017).
49. Mageroy, M. H. *et al.* Priming of inducible defenses protects Norway spruce against tree-killing bark beetles. *Plant Cell Environ.* **43**, 420–430 (2020).
50. Moisan, K. *et al.* Fungal volatiles influence plant defence against above-ground and below-ground herbivory. *Funct. Ecol.* **34**, 2259–2269 (2020).
51. Russo, M. L., Pelizza, S. A., Cabello, M. N., Stenglein, S. A. & Scorsetti, A. C. Endophytic colonisation of tobacco, corn, wheat and soybeans by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales). *Biocontrol Sci. Technol.* **25**, 475–480 (2015).
52. Russo, M. L. *et al.* Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) Merr. growth and yield. *J. King Saud Univ. Sci.* **31**, 728–736 (2019).
53. Wei, Q. Y. *et al.* Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* increases the resistance of tomatoes against *Bemisia tabaci*. *Arthropod Plant Interact.* **14**, 289–300 (2020).
54. Tiwari, M., Pati, D., Mohapatra, R., Sahu, B. B. & Singh, P. The impact of microbes in plant immunity and priming induced inheritance: a sustainable approach for crop protection. *Plant Stress* **4**, 100072 (2022).
55. Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E. & Flors, V. Defense priming: an adaptive part of induced resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **22**, 31–46 (2025).
56. Smaniotto, L. F. & Panizzi, A. R. Interactions of selected species of stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) from leguminous crops with plants in the Neotropics. *Florida Entomol.* **98**, 7–17 (2015).
57. Obermayr, U., Ruther, J., Bernier, U. R., Rose, A. & Geier, M. Evaluation of a push-pull approach for *Aedes aegypti* (L.) using a novel dispensing system for spatial repellents in the laboratory and in a semi-field environment. *PLoS One* **10**, e0129878 (2015).
58. Tabashnik, B. E., Gassmann, A. J., Crowder, D. W. & Carrière, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nat. Biotechnol.* **26**, 199–202 (2008).

59. Wang, Y. *et al.* Species diversity and virulence potential of the *Beauveria bassiana* complex and *Beauveria scarabaeidicola* complex. *Front. Microbiol.* **13**, 841604 (2022).
60. Manfrino, R. *et al.* Molecular taxonomic characterization and infra-specific diversity of entomopathogenic *Beauveria bassiana* fungi from Argentina. *Fungal Biol.* **128**, 1800–1805 (2024).
61. Kuramae-Izioka, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. *Rev. UNIMAR* **19**, 683–689 (1997).
62. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* 315–322 (Academic Press, San Diego, 1990).
63. Stiller, J. W. & Hall, B. D. The origin of red algae: implications for plastid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***94**, 4520–4525 (1997).
64. Green, P. *PHRAP Documentation* (University of Washington, Seattle, 1996).
65. Ewing, B. & Green, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Res.***8**, 186–194 (1998).
66. Gordon, D., Abajian, C. & Green, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* **8**, 195–202 (1998).
67. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.***215**, 403–410 (1990).
68. Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.***32**, 1792–1797 (2004).
69. Posada, D. & Buckley, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst. Biol.* **53**, 793–808 (2004).
70. Posada, D. & Crandall, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**, 817–818 (1998).
71. Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics***19**, 1572–1574 (2003).
72. Huson, D. H. & Scornavacca, C. Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Syst. Biol.* **61**, 1061–1067 (2012).
73. DeVries, Z. C., Saveer, A. M., Mick, R. & Schal, C. Bed bug (Hemiptera: Cimicidae) attraction to human odors: validation of a two-choice olfactometer. *J. Med. Entomol.* **56**, 362–367 (2019).
74. Roberts, J. M., Clunie, B. J., Leather, S. R., Harris, W. E. & Pope, T. W. Scents and sensibility: best practice in insect olfactometer bioassays. *Entomol. Exp. Appl.* **171**, 808–820 (2023).
75. Petrini, O. & Fisher, P. J. Fungal endophytes in *Salicornia perennis*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **87**, 647–651 (1986).
76. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2024).
77. Rehner, S. A. & Buckley, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* **97**, 84–98 (2005).
78. Ronquist, F. *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* **61**, 539–542 (2012).

Figure

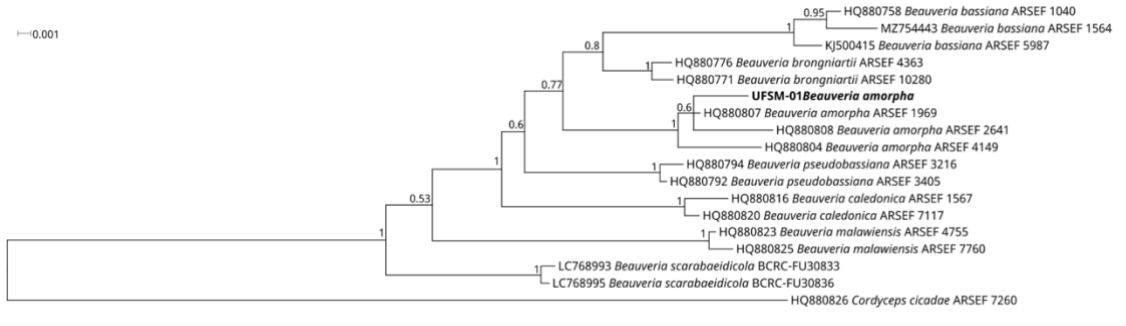


Figure 1. Bayesian phylogenetic tree obtained from the concatenated sequences of the ITS region and the RPB1 gene of *Beauveria* species, used for species-level identification of the UFSM-01 isolate. The numbers at the nodes represent the support values of these inferences.

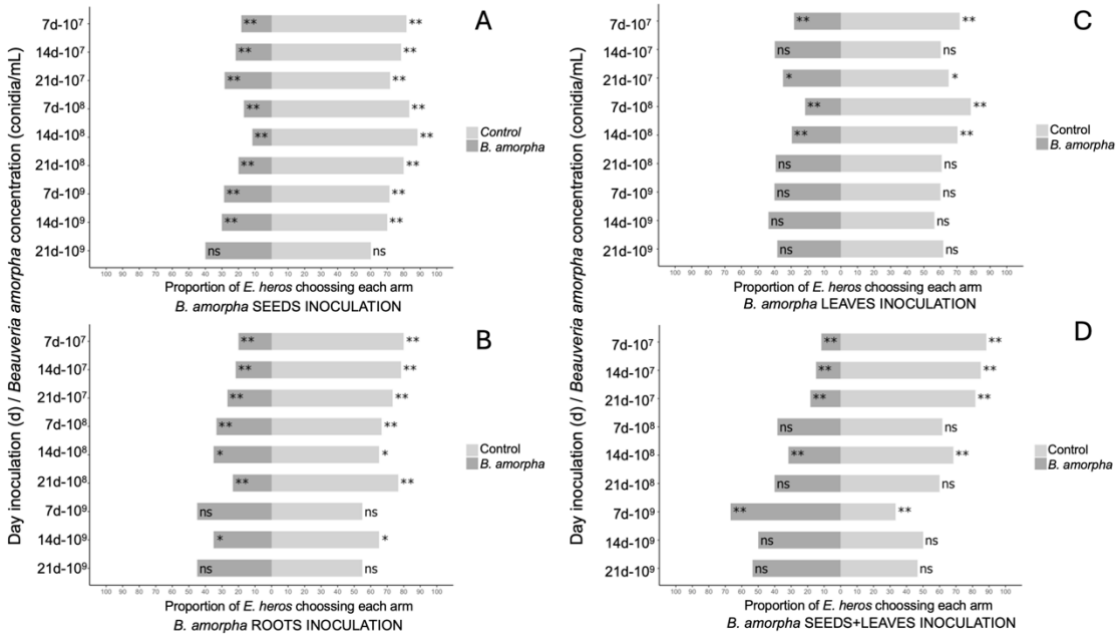


Figure 2. Olfactory response of *Euschistus heros* in Y-tube olfactometer assays to odors from soybean plants inoculated with *Beauveria amorpha* (dark gray) and non-inoculated plants (control, light gray), evaluated at different fungal concentrations and time points after inoculation. The inoculation methods were as follows: (a) seed inoculation, (b) root inoculation (soil drench), (c) foliar inoculation, and (d) combined seed and foliar inoculation. Statistical analyses were performed using the chi-square (χ^2) test. Significance levels are indicated as follows: **p < 0.01, *p < 0.05, and ns (not significant).

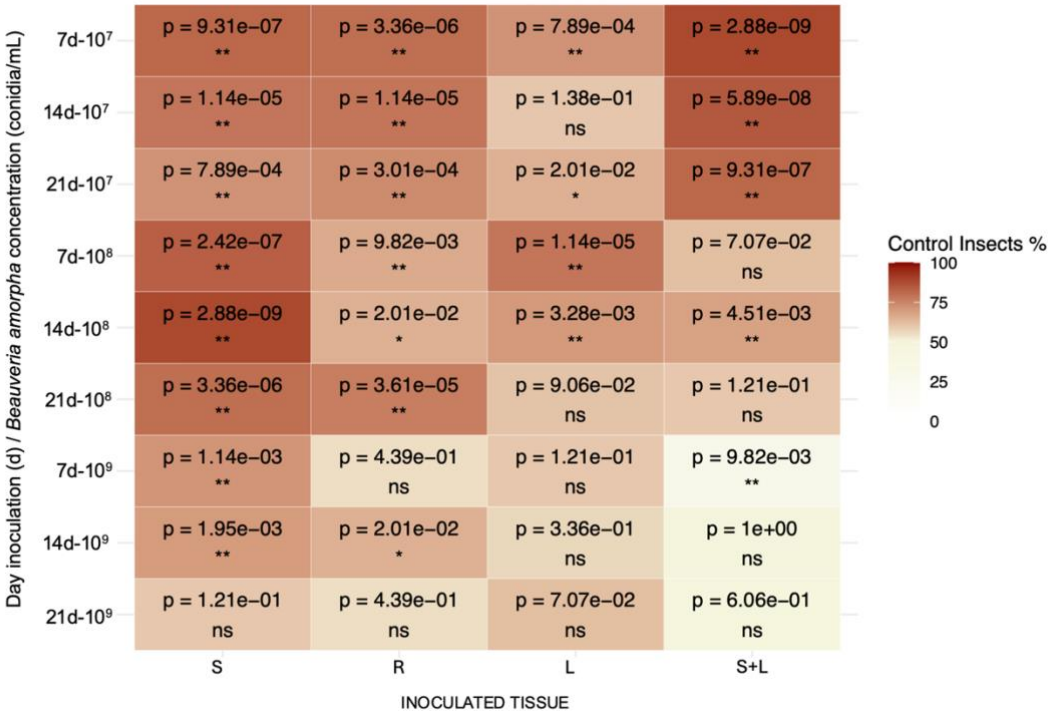


Figure 3. Heatmap representing the olfactory responses of *Euschistus heros* to soybean plants inoculated with *Beauveria amorpha* at different conidial concentrations (10^7, 10^8, and 10^9 conidia/mL), inoculation methods (S = seed; R = root; L = leaf; SL = seed + leaf), and times after inoculation (7, 14, and 21 d). Each cell represents the *p*-value obtained from the chi-square (χ^2) test comparing the number of insects choosing control (non-inoculated) versus inoculated plants. Color intensity represents the percentage of insects that chose the control plants, with darker tones indicating a greater preference for the control plants. Significance levels: $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*), and ns = not significant.

Table

Table 1. Average percentage colonization (±SEM) of *Beauveria amorpha* inoculated on soybean seeds and evaluated in different plant tissues (leaves, pods, stems, and roots) 21 days after the fungal inoculation. Different letters within the same inoculation method indicate significant differences (Tukey's test, $p < 0.05$).

B. amorpha concentration	Days after inoculation	Confirmation of *B. amorpha* in plant tissues			
		Leaf	Pod	Stem	Root
10^7 conidia/mL	7	10 ± 5.8 abc	5 ± 5.0 bc	5 ± 5.0 bc	15 ± 9.6 abc
	14	0 ± 0.0c	0 ± 0.0 c	0 ± 0.0 c	0 ± 0.0 c
	21	5 ± 5.0 bc	0 ± 0.0 c	0 ± 0.0 c	0 ± 0.0 c

	7	10 ± 10.0 abc	20 ± 11.5 abc	35 ± 17.1 ab	15 ± 9.6 abc
10^8 conidia/mL	14	0 ± 0.0 c	10 ± 5.8 abc	10 ± 10.0 abc	5 ± 5.0 bc
	21	5 ± 5.0 bc	10 ± 5.8 abc	0 ± 0.0 c	5 ± 5.0 bc
	7	10 ± 5.8 abc	20 ± 8.2 abc	40 ± 14.1 a	20 ± 8.2 abc
10^9 conidia/mL	14	0 ± 0.0 c	10 ± 10.0 abc	10 ± 5.8 abc	10 ± 5.8 abc
	21	10 ± 5.8 abc	10 ± 5.8 abc	5 ± 5.0 bc	5 ± 5.0 bc

Mean ± standard error of the mean (SEM). Different letters within the same inoculation method indicate significant differences (Tukey's test, $p < 0.05$).

Table 2. Mean percentage colonization (±SEM) of *Beauveria amorpha* inoculated via soil on soybean roots (drench) and evaluated in different plant tissues (leaves, pods, stems, and roots) at 7, 14, and 21 days after inoculation.

		Confirmation of *B. amorpha* in plant tissues			
B. amorpha concentration	Days after inoculation	Leaf	Pod	Stem	Root
	7	10 ± 10.0 d	10 ± 5.8 d	0 ± 0.0 d	35 ± 15.0 abcd
10^7 conidia/mL	14	10 ± 5.8 d	10 ± 10.0 d	0 ± 0.0 d	5 ± 5.0 d
	21	15 ± 9.6 cd	10 ± 5.8 d	0 ± 0.0 d	0 ± 0.0 d
	7	15 ± 9.6 d	10 ± 5.8 d	50 ± 5.8 abc	55 ± 9.6 ab
10^8 conidia/mL	14	10 ±10.0 d	10 ± 5.8 d	15 ± 5.0 cd	25 ± 9.6 bcd
	21	25 ± 9.6 bcd	5 ± 5.0 d	0 ± 0.0 d	10 ± 5.8 d
	7	20 ± 11.5 bcd	25 ± 15.0 bcd	50 ± 5.8 abc	70 ± 10.0 a
10^9 conidia/mL	14	15 ± 9.6 cd	15 ± 5.0 cd	10 ± 5.8 d	25 ± 9.6 bcd
	21	5 ± 5.0 d	10 ± 10.0 d	5 ± 5.0 d	15 ± 9.6 cd

Mean ± standard error of the mean. Different letters within the same inoculation method indicate significant differences (Tukey's test, $p < 0.05$).

Table 3. Mean percentage colonization (±SEM) of *Beauveria amorpha* inoculated via foliar spray and evaluated in different plant tissues (leaves, pods, stems, and roots) at 7, 14, and 21 d after fungal inoculation. Different letters within the same inoculation method indicate significant differences (Tukey test, $p < 0.05$).

		Confirmation of *B. amorpha* in plant tissues			
B. amorpha concentration	Days after inoculation	Leaf	Pod	Stem	Root

10^7 conidia/mL	7	60 ± 14.1abc	15 ± 15.0 de	25 ± 9.6 cde	15 ± 9.6 de
	14	20 ± 8.2 cde	10 ± 5.8 de	10 ± 5.8 de	5 ± 5.0 de
	21	10 ± 5.8 de	0 ± 0.0 e	10 ± 5.8 de	5 ± 5.0 de
10^8 conidia/mL	7	70 ± 10.0 ab	20 ± 8.2 cde	30 ± 5.8 bcde	15 ± 9.6 de
	14	35 ± 9.6 bcde	15 ± 5.0 cde	25 ± 5.0 cde	5 ± 5.0 de
	21	10 ± 5.8 de	10 ± 5.8 de	5 ± 5.0 de	5 ± 5.0 de
10^9 conidia/mL	7	80 ± 14.1 a	30 ± 17.3 bcde	45 ± 9.6 dcd	20 ± 8.2 cde
	14	35 ± 9.6 bcde	35 ± 9.6 bcde	35 ± 5.0 bcde	10 ± 5.8 de
	21	15 ± 5.0 de	0 ± 0.0 e	5 ± 5.0 de	10 ± 10.0 de

Mean ± Standard error of the mean. Different letters within the same inoculation method indicate significant differences (Tukey's test, $p < 0.05$).

Table 4. Mean percentage colonization (±SEM) of *Beauveria amorpha* inoculated via seed inoculation + foliar spraying and evaluated in different plant tissues (leaves, pods, stems, and roots) at 7, 14, and 21 d after fungal inoculation.

		Confirmation of *B amorpha* in plant tissues			
B. amorpha concentration	Days after inoculation	Leaf	Pod	Stem	Root
10^7 conidia/mL	7	65 ± 12.6 ab	5 ± 5.0 d	30 ± 5.8 bcd	15 ± 9.6 cd
	14	30 ± 5.8 bcd	10 ± 5.8 cd	5 ± 5.0 d	5 ± 5.0 d
	21	5 ± 5.0 d	10 ± 5.8 cd	5 ± 5.0 d	5 ± 5.0 d
10^8 conidia/mL	7	65 ± 17.1 ab	15 ± 9.6 cd	30 ± 17.3 bcd	30 ± 12.9 bcd
	14	40 ± 8.2 abcd	15 ± 15.0 cd	5 ± 5.0 d	5 ± 5.0 d
	21	15 ± 9.6 cd	10 ± 5.8 cd	0 ± 0.0 d	5 ± 5.0 d
10^9 conidia/mL	7	80 ± 8.2 a	65 ± 20.6 ab	65± 17.1 ab	65 ± 12.6 ab
	14	55 ± 9.6 abc	20 ± 11.5 bcd	25 ± 12.6 bcd	20 ± 8.2 bcd
	21	25 ± 9.6 bcd	15 ±5.0 cd	5 ± 5.0 d	5 ± 5.0 d

Mean ± standard error of the mean. Different letters within the same inoculation method indicate significant differences (Tukey's test, $p < 0.05$).

CAPÍTULO 5- CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo foi desenvolvido a partir da alta necessidade de ampliar a compreensão e diferentes possibilidades do manejo de insetos sugadores na cultura da soja, em particular, o percevejo-marrom *Euschistus heros*, onde relevância agronômica e dificuldade de controle representam um dos principais desafios da Entomologia Agrícola atual. Tradicionalmente, o controle do *E. heros* é realizado com o uso intensivo de inseticidas com principio ativos químicos, estratégia que apresenta limitações crescentes em termos de eficiência, sustentabilidade e impacto ambiental, tendo falhas de controle e acarretando problemas socioambientais. Esses problemas são agravados quando sabemos que há uma demanda global relacionada a diminuição do uso de água na produção agrícola e a necessidade de uma agricultura mais sustentável. Nesse contexto, esta tese propôs e investigou uma abordagem alternativa e integrada, fundamentada no uso do fungo entomopatogênico endofítico *Beauveria amorpha* como componente ativo do agroecossistema, capaz de atuar de forma sistêmica nas interações planta–inseto.

Ao longo dos três capítulos desta tese, demonstrou-se que a associação endofítica entre plantas de soja e o fungo entomopatogênico *B. amorpha* transcende o paradigma clássico do controle biológico baseado exclusivamente na patogenicidade direta. Os resultados obtidos evidenciam que a colonização endofítica por *B. amorpha* influencia múltiplos níveis da interação multitrofica, afetando simultaneamente o comportamento do inseto-praga, sua sobrevivência e a fisiologia da planta hospedeira.

O primeiro capítulo da tese demostrou evidências claras de que a planta pode funcionar como uma via ecológica para o controle sistêmico do inseto, ao permitir a aquisição do fungo por *E. heros* via alimentação. A confirmação molecular da presença de *B. amorpha* em tecidos vegetais e nos insetos expostos reforça a via alimentar como rota funcional de infecção, superando uma das principais limitações do uso clássico de fungos entomopatogênicos frente a hemípteros. Esse resultado amplia o mecanismo de ação do fungo, demostrando

que *B. amorpha* pode ser utilizado para diferentes fins e formas na agricultura. Logo, foi verificado que a atuação do fungo não se restringe à superfície do inseto, mas pode ocorrer de forma integrada ao metabolismo da planta.

No segundo capítulo da tese, o foco foi entender o que acontece com plantas inoculadas com fungo quando está sob herbivoria do inseto sugador. Esses resultados revelaram um eixo central desta tese: o papel do fungo como modulador do trade-off crescimento–defesa. A associação com *B. amorpha* promoveu uma reprogramação fisiológica sistêmica na soja, caracterizada pela manutenção da eficiência fotossintética, do crescimento e do equilíbrio hormonal mesmo sob herbivoria por *E. heros*. Logo, percebeu-se que o fungo não atua por intensificação de defesas clássicas, mas por promover tolerância ao estresse biótico, reduzindo os custos metabólicos associados à herbivoria e preservando funções essenciais da planta.

No terceiro e último capítulo, a interferência do fungo no comportamento de *E. heros* revelou que a planta colonizada endofiticamente deixa de ser um elemento passivo da interação, passando a atuar como mediadora ativa na comunicação química com o inseto. A modulação da atratividade da soja sugere que alterações na emissão de compostos orgânicos voláteis podem reduzir a colonização inicial e o estabelecimento populacional do percevejo, destacando a importância de mecanismos comportamentais como componentes estratégicos no manejo de insetos sugadores. Além disso, este capítulo mostrou que concentrações fúngicas baixas são mais eficientes que concentrações altas, mostrando que o equilíbrio entre microrganismo e planta auxiliam no manejo do inseto praga.

Quando consideramos os três capítulos em conjunto, é verificável que *B. amorpha* atua como um componente multifuncional no sistema soja–percevejo, influenciando o comportamento do inseto, sua sobrevivência e o desempenho fisiológico e hormonal da planta. Essa abordagem integrada reforça a necessidade de repensar o papel dos fungos entomopatogênicos nos agroecossistemas, não apenas como agentes de mortalidade direta, mas como moduladores de interações ecológicas complexas. Além do mais, ao explorar a capacidade de uma espécie pouco estudada do gênero *Beauveria*, esta tese

contribui para ampliar a diversidade funcional considerada nos programas de controle biológico, reduzindo a dependência quase exclusiva de uma espécie, como a *B. bassiana*.

Do ponto de vista conceitual, os resultados desta tese fortalecem a ideologia de que o manejo sustentável de insetos sugadores deve considerar mecanismos sistêmicos, comportamentais e fisiológicos, integrando planta, inseto e microrganismos associados. Essa perspectiva está alinhada aos princípios do manejo integrado de pragas e da ecologia de sistemas, oferecendo bases para o desenvolvimento de estratégias mais resilientes e ambientalmente responsáveis. Podendo ser explorada e, quando refinada, ser futuramente aplicada em sistemas de produção agrícola.

Apesar dos avanços alcançados com resultados promissores, este também evidencia lacunas que abrem importantes perspectivas para pesquisas futuras. Pesquisas adicionais são necessários para avaliar a persistência e a estabilidade da colonização endofítica por *B. amorpha* em diferentes genótipos de soja e sob condições de campo, bem como, para compreender como fatores ambientais influenciam a eficiência dessa associação. Além disso, é importante realizar a caracterização detalhada dos compostos orgânicos voláteis modulados pela presença do fungo, permitindo identificar quais sinais químicos estão diretamente associados às alterações comportamentais observadas em *E. heros*.

Adicionalmente, investigações futuras podem explorar a interação de *B. amorpha* com outros insetos sugadores de importância agrícola, avaliando o potencial de generalização dos mecanismos descritos nesta tese. A integração dessa abordagem com outros agentes de controle biológico, como parasitoides e predadores, também representa um passo importante para compreender os efeitos do endofitismo em redes ecológicas mais complexas. Entender como um sistema digestivo como o do *E. heros*, que se alimenta apenas de material líquido e tem câmera filtro consegue ser afetado pelo fungo entomopatogênico endofítico via alimentação. E, por fim, estudos voltados à formulação, métodos de inoculação e viabilidade operacional do uso de fungos entomopatogênicos

endofíticos em sistemas comerciais são fundamentais para a transposição dos conhecimentos aqui gerados para a prática agrícola.

Em conclusão, esta tese demonstra que a associação endofítica entre *B. amorpha* e plantas de soja representa uma estratégia promissora para o manejo sistêmico de *Euschistus heros* e melhora da qualidade da planta, ampliando o entendimento sobre o papel dos fungos entomopatogênicos nos agroecossistemas. Ao integrar efeitos comportamentais, letais e fisiológicos em uma abordagem multitrofica, este trabalho contribui para o avanço conceitual e aplicado da Entomologia Agrícola, oferecendo novas perspectivas para o desenvolvimento de sistemas da produção agrícola mais sustentáveis, eficientes e biologicamente integrados.

Nota

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.