

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DANIELE RUELA MENDES

**Isolamento de fungos endofíticos e estudo metabolômico de  
espécies de *Coffea* resistentes ao bicho-mineiro**

Monte Carmelo

2025

DANIELE RUELA MENDES

**Isolamento de fungos endofíticos e estudo metabolômico de  
espécies de *Coffea* resistentes ao bicho-mineiro**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para obtenção do título de doutor em Agronomia.

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientadora: Vanessa Andaló Mendes de Carvalho

Coorientador: Marcus Vinicius Sampaio

Monte Carmelo

2025

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M538 Mendes, Daniele Ruela, 1983-  
2025 Isolamento de fungos endofíticos e estudo metabolômico  
de espécies de Coffea resistentes ao bicho-mineiro  
[recurso eletrônico] / Daniele Ruela Mendes. - 2025.

Orientadora: Vanessa Andaló Mendes de Carvalho.  
Coorientador: Marcus Vinicius Sampaio.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Pós-graduação em Agronomia.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2025.293>  
Inclui bibliografia.

1. Agronomia. I. Carvalho, Vanessa Andaló Mendes de,  
1977-, (Orient.). II. Sampaio, Marcus Vinicius, 1971-,  
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.  
Pós-graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU: 631

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

DANIELE RUELA MENDES

**Isolamento de fungos endofíticos e estudo metabolômico de  
espécies de *Coffea* resistentes ao bicho-mineiro**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para obtenção do título de doutor em Agronomia.

Área de concentração: Produção Vegetal

Monte Carmelo, 09 de maio de 2025 de abril de 2025

Banca Examinadora:

Dra. Ana Carolina Silva Siquieroli (UFU)

Dra. Gleice Aparecida de Assis (UFU)

Dr. Lucas Silva de Faria (UNIFUCAMP)

Dra. Luciana Maria de Lima (UNIFUCAMP)

Dra. Vanessa Andaló Mendes de Carvalho (UFU) – Presidente



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia  
Rodovia BR 050, Km 78, Bloco 1CCG, Sala 206 - Bairro Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
Telefone: (34) 2512-6715/6716 - [www.ppgagro.iciag.ufu.br](http://www.ppgagro.iciag.ufu.br) - [posagro@ufu.br](mailto:posagro@ufu.br)



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Agronomia				
Defesa de:	Tese 001/2025, PPGAGRO				
Data:	Nove de maio de dois mil e vinte e cinco	Hora de início:	08:00	Hora de encerramento:	11:30
Matrícula do Discente:	12113AGR001				
Nome do Discente:	Daniele Ruela Mendes				
Título do Trabalho:	Isolamento de Fungos Endofíticos e Estudo Metabolômico de Espécies de <i>Coffea</i> Resistentes ao Bicho-Mineiro				
Área de concentração:	Produção Vegetal				
Linha de pesquisa:	Produção Vegetal em Áreas de Cerrado				

Reuniu-se por videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, assim composta: Professores Doutores: Gleice Aparecida de Assis - UFU; Ana Carolina Silva Siquieroli - UFU; Luciana Maria de Lima - UNIFUCAMP; Lucas Silva de Faria - UNIFUCAMP; Vanessa Andaló Mendes de Carvalho - UFU orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Vanessa Andaló Mendes de Carvalho - UFU, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando a candidata:

Aprovado.

Essa tese possui mérito para ser indicada como destaque do Programa? ( X ) SIM      NÃO ( )

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Andalo Mendes de Carvalho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/05/2025, às 11:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gleice Aparecida de Assis, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/05/2025, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Silva de Faria, Usuário Externo**, em 09/05/2025, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Maria de Lima, Usuário Externo**, em 09/05/2025, às 13:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Silva Siqueroli, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/05/2025, às 14:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site  
[https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **6291888** e o código CRC **96A9534B**.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me conceder sabedoria, força e serenidade para conduzir e concluir meu doutorado. À minha mãe, Maria das Graças, pelas constantes orações, amor incondicional e apoio em todos os momentos.

À minha filha, pelo carinho e pela compreensão diante das inúmeras horas em que precisei estar ausente de casa para realizar este sonho. Sua paciência e amor me motivaram todos os dias.

Ao Gilberto, por todo amor, compreensão e companheirismo. Sem você, eu não teria conseguido chegar até aqui. Obrigada por caminhar ao meu lado e por acreditar em mim.

À minha tia Joana (Dute), ao tio Máximo e aos meus primos Luciana e Leonardo, pelas boas vibrações, orações e palavras de encorajamento sempre tão oportunas.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Andaló, pela dedicação e preocupação com meu desenvolvimento acadêmico e pessoal. Sou imensamente grata pela orientação, amizade, paciência e confiança ao longo dessa jornada.

Ao Dr. Oliveira Guerreiro Filho, pesquisador do Centro de Café Alcides Carvalho do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), pela colaboração essencial na execução deste projeto. Sua contribuição foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos professores Bruno Vieira, André Firmino e Gilberto Mendes (meu amor e parceiro de vida), pelo apoio e por gentilmente me cederem o Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, onde realizei grande parte dos meus experimentos. Muito obrigada pela generosidade e incentivo.

Aos colegas de laboratório e aos técnicos que me auxiliaram na condução dos experimentos, deixo meu sincero agradecimento pelo apoio e pela parceria. Os momentos de descontração durante os cafés tornaram essa jornada mais leve e agradável.

À minha grande amiga Amélia, que sempre esteve ao meu lado. Seu jeito doce, seu apoio constante e sua amizade verdadeira tornaram essa caminhada mais leve e possível.

Ao Grupo de Pesquisa e Análise Metabolômica da Universidade Federal de Viçosa – Campus Rio Paranaíba, liderado pelo Prof. Dr. Frederico Garcia Pinto, meus sinceros agradecimentos. Muito obrigada a todos pela realização das análises metabolômicas. Vocês foram essenciais para a concretização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro que viabilizou a realização deste doutorado.

## RESUMO

O bicho-mineiro do cafeeiro (*Leucoptera coffeella*) é uma das principais pragas da cultura do café, especialmente em cultivares de *Coffea arabica*, altamente suscetíveis ao ataque. Em contrapartida, espécies selvagens como *C. racemosa* e *C. stenophylla* têm se destacado como fontes promissoras de resistência natural. Este trabalho investigou os mecanismos químicos e microbianos associados à resistência dessas espécies ao bicho-mineiro, com ênfase em compostos bioativos e na diversidade de fungos endofíticos presentes nas folhas de genótipos *Coffea* resistentes ao bicho-mineiro. No estudo metabolômico comparativo, realizado com os genótipos *Coffea arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC 62, *C. racemosa*, *C. stenophylla* e o híbrido experimental resistente IAC 1059 (oriundo do cruzamento entre *C. arabica* e *C. racemosa*), foram identificadas assinaturas químicas específicas associadas à resistência, incluindo o acúmulo de ácido málico, ácido succínico, ácido isotreônico e ácido quínico. Esses compostos estão amplamente relacionados a mecanismos de defesa, como acidificação do ambiente celular, quelação de íons metálicos e sinalização de estresse oxidativo. O híbrido resistente apresentou um perfil metabolômico intermediário, refletindo a herança parcial de características de resistência de *C. racemosa*, com destaque para o aumento de metabólitos como ácido isotreônico, ácido glicólico, ácido pentanoico e maltotriose. Paralelamente, foram obtidos 65 isolados de fungos endofíticos a partir das folhas de *C. racemosa* e *C. stenophylla*. Entre os isolados, um fungo identificado como pertencente ao gênero *Colletotrichum* demonstrou potencial entomopatogênico, causando 70% de mortalidade em larvas de *Tenebrio molitor*. Este isolado também apresentou capacidade de produzir quitinase em meio contendo quitina coloidal, enzima potencialmente envolvida na degradação da cutícula de insetos. Os resultados deste trabalho evidenciam que a resistência ao bicho-mineiro em espécies de *Coffea* envolve um conjunto complexo de fatores químicos e biológicos, e que tanto os metabólitos de defesa quanto os fungos endofíticos podem desempenhar papéis complementares nesse processo. Esses achados reforçam a importância do uso da biodiversidade do gênero *Coffea* no desenvolvimento de estratégias sustentáveis para o manejo de pragas na cafeicultura.

**Palavras-chave:** cafeeiro; *Leucoptera coffeella*; fungos entomopatogênicos; metabólitos.

## ABSTRACT

The coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*) is one of the most significant pests affecting coffee cultivation, particularly in cultivars of *Coffea arabica*, which are highly susceptible to its attack. In contrast, wild species such as *C. racemosa* and *C. stenophylla* have emerged as promising sources of natural resistance. This study investigated the chemical and microbial mechanisms associated with resistance to the coffee leaf miner in these species, with a focus on bioactive compounds and the diversity of endophytic fungi found in the leaves of resistant *Coffea* genotypes. In a comparative metabolomic analysis involving *Coffea arabica* cv. Catuáí Amarelo IAC 62, *C. racemosa*, *C. stenophylla*, and the experimental resistant hybrid IAC 1059 (derived from a cross between *C. arabica* and *C. racemosa*), specific chemical signatures associated with resistance were identified, including the accumulation of malic acid, succinic acid, isotreonic acid, and quinic acid. These compounds are broadly linked to defense mechanisms such as cellular acidification, metal ion chelation, and oxidative stress signaling. The resistant hybrid displayed an intermediate metabolomic profile, reflecting the partial inheritance of resistance traits from *C. racemosa*, notably with increased levels of isotreonic acid, glycolic acid, pentanoic acid, and maltotriose. In parallel, 65 endophytic fungal isolates were obtained from the leaves of *C. racemosa* and *C. stenophylla*. Among them, one isolate identified as belonging to the genus *Colletotrichum* demonstrated entomopathogenic potential, causing 70% mortality in *Tenebrio molitor* larvae. This isolate also produced chitinase in a medium containing colloidal chitin, an enzyme potentially involved in insect cuticle degradation. The findings of this study highlight that resistance to the coffee leaf miner in *Coffea* species involves a complex interplay of chemical and biological factors, and that both defensive metabolites and endophytic fungi may play complementary roles in this process. These results reinforce the importance of leveraging *Coffea* biodiversity in developing sustainable pest management strategies for coffee cultivation.

**Keywords:** coffee tree; *Leucoptera coffeella*; entomopathogenic fungi; metabolites.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	7
1.1    Cafeeiro.....	7
1.2    Bicho-mineiro ( <i>Leucoptera coffeella</i> ) .....	8
1.3    Mecanismos de defesa.....	11
1.4    Estudos realizados sobre a interação cafeeiro - <i>Leucoptera coffeella</i> .....	14
1.5    Metabólitos secundários.....	17
1.7    Interações entre fungos endofíticos e plantas.....	20
CAPÍTULO 2: ISOLAMENTO E TRIAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM <i>COFFEA</i> RACEMOSA E <i>COFFEA STENOPHYLLA</i> . COM POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO.....	24
2.1    Introdução .....	24
2.2    Material e Métodos .....	25
2.2.1    Isolamento de fungos endofíticos .....	25
2.2.2    Triagem de fungos endofíticos com potencial entomopatogênico .....	26
2.2.3    Avaliação do mecanismo de ação .....	27
2.2.4    Avaliação da atividade lipolítica do isolado S7-23 .....	28
2.2.5    Avaliação da atividade proteolítica do isolado S7-23.....	28
2.2.6    Avaliação da atividade da enzima quitinase .....	29
2.2.7    Caracterização molecular do isolado fúngico .....	30
2.3    Resultados .....	31
2.3.1    Isolamento e seleção de fungos endofíticos de <i>Coffea</i> e avaliação de seu potencial como agentes de biocontrole de insetos.....	31
2.3.2    Avaliação da atividade proteolítica .....	37
2.3.3    Avaliação da atividade lipolítica.....	38
2.3.4    Avaliação da atividade quitinolítica.....	39
2.3.5    Identificação do fungo endofítico isolado de <i>Coffea stenophyla</i> .....	40
2.4    Discussão .....	41
2.5    Conclusão .....	47
CAPÍTULO 3: ESTUDO METABOLÔMICO DE ESPÉCIES DE <i>COFFEA</i> .....	49
3.1    Introdução .....	49
3.2    Material e Métodos .....	52
3.3    Resultados .....	54
3.4    Discussão .....	67

3.5	Conclusão .....	72
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74

## CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Cafeeiro

O cafeeiro é uma planta perene pertencente à família Rubiaceae, subfamília Ixoroideae e gênero *Coffea* L. O gênero *Coffea* L. contém as três espécies utilizadas na produção do café: *C. arabica* L. (café arábica), *C. canephora* Pierre ex A. Froehner (café robusta ou canilon) e *C. liberica* Hiern (café liberiano, também conhecido como Liberica ou café excelsa). Dentre as espécies do gênero *Coffea*, *C. arabica* destaca-se como a mais cultivada e economicamente relevante em escala global. Essa predominância deve-se à combinação de características agronômicas e comerciais, como a superior qualidade sensorial dos grãos, com aromas e sabores mais suaves e complexos, além do menor teor de cafeína quando comparada a outras espécies, como *C. canephora* (Davis et al., 2006; Perrois et al., 2014). Entretanto, *C. canephora* vem ganhando espaço e se tornando cada vez mais competitivo no cenário da cafeicultura, sobretudo pelas altas produtividades, menor custo de produção e maior tolerância a estresses bióticos e abióticos, como pragas, doenças e déficit hídrico. O cultivo de *C. canephora* é especialmente vantajoso em regiões de baixas altitudes e temperaturas mais elevadas, onde *C. arabica* apresenta menor desempenho (CONAB, 2024).

Botanicamente, *C. arabica* é uma espécie tetraploide com  $2n = 4x = 44$  cromossomos e autógama com cerca de 10% de polinização cruzada. Trata-se de uma planta de porte arbustivo, com altura entre 2 e 4 metros, folhas opostas, elípticas, de coloração verde-brilhante, e ramificação dicotômica. Suas flores são andróginas, brancas e perfumadas, e os frutos são drupas conhecidas como “cerejas”, contendo normalmente dois grãos. Agronomicamente, a espécie apresenta melhor desempenho em altitudes entre 800 e 2.000 metros, com temperaturas médias entre 18°C e 22°C e pluviosidade entre 1.200 e 2.000 mm anuais (Carvalho, 2008).

O café arábica tem sua provável origem na Etiópia. Após a sua domesticação nesse país, o café arábica foi introduzido no Iêmen, de onde foi levado para a Indonésia e para a Ilha de Reunião (anteriormente denominada Ilha de Bourbon). Os cafés introduzidos na Indonésia deram origem à variedade botânica Típica (*C. arabica* var. *Typica* Cramer), enquanto os introduzidos na Ilha de Bourbon originaram a variedade botânica Bourbon (*C. arabica* var. *Bourbon* Rodr. ex Choussy). O cultivo do café arábica se expandiu pela América do Sul e América Central, com base em cultivares que tiveram as suas origens genéticas nas variedades Típica e Bourbon (Davis et al., 2006).

No Brasil, o café foi introduzido em 1727, inicialmente no estado do Pará, onde começou a ser cultivado na cidade de Belém. Nos anos seguintes, foi levado para o Maranhão e o Rio de Janeiro, sendo cultivado principalmente para consumo doméstico. Aproximadamente em 1820, chegou ao Vale do Paraíba, na Serra do Mar, onde a presença do solo fértil conhecido como "terra roxa", foi

ideal para o cultivo de café. A partir de São Paulo, o cafeiro foi sendo cultivado em Minas Gerais, Espírito Santo e Paraná (BRASIL Ministério da Agricultura e Pecuária, 2023).

O Brasil tem se consagrado como o maior produtor e exportador de café do mundo, mantendo uma posição de destaque no mercado global por décadas. Em 2024, o Brasil exportou 50,5 milhões de sacas de 60 Kg de café, estabelecendo um novo recorde. Esse desempenho representou um crescimento de 28,8% em relação ao ano anterior. Como resultado, o país gerou uma receita de US\$ 12,3 bilhões, o maior valor já registrado, com um aumento de 52,6% em comparação a 2023 (CONAB, 2024).

Em relação aos destinos do café brasileiro, 142 países receberam o produto ao longo de 2024. Os Estados Unidos e a Alemanha foram os maiores compradores, correspondendo a 16,4% e 15,4% do total exportado, respectivamente. Outros destinos importantes incluíram a Bélgica (9,1%), Itália (8,1%) e Japão (4,9%) (CONAB, 2024).

Embora a cafeicultura do Brasil tenha experimentado grandes ganhos econômicos, os desafios para a manutenção dessa cadeia produtiva são vários, entre os quais estão as pragas que ameaçam a cultura, incluindo o bicho-mineiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet) (Lepidoptera: Lyonetiidae).

## 1.2 Bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*)

Embora tenha origem no continente africano, *L. coffeella*, é atualmente uma praga cosmopolita, monófaga, presente nas folhas de plantações de café em diversas regiões, incluindo a África, Ásia e países Neotropicais, como América Central, ilhas do Caribe e América do Sul. No Brasil, a presença do bicho-mineiro foi detectada pela primeira vez em meados do século XIX, e desde então, tornou-se uma das principais pragas da cultura cafeira no país (Gallo et al., 2002). Atualmente, onde quer que o café seja cultivado no Brasil, o bicho-mineiro está presente, representando um desafio contínuo para os produtores (Almeida et al., 2020).

O bicho-mineiro é um inseto que passa por uma metamorfose completa, com seu ciclo de vida composto pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). Em condições de temperatura de 25°C, o estágio de ovo pode durar em média cinco dias, o estágio larval cerca de 12 dias e o de pupa aproximadamente cinco dias, totalizando cerca de 22 dias até atingir a fase adulta. O tempo total do ciclo de vida desse inseto pode variar conforme fatores como temperatura, umidade e distribuição irregular das chuvas. Durante a estação seca, os ataques da praga tendem a ser mais intensos em comparação aos períodos úmidos. Em média podem ocorrer oito gerações por ano, podendo chegar a 12 gerações (Reis; Souza, 2002).

Além das condições climáticas, outros fatores influenciam nos níveis de infestação da praga. Entre eles, destaca-se o espaçamento entre as plantas cultivadas: espaçamentos maiores

proporcionam melhor ventilação, o que pode favorecer a incidência da praga (Souza; Reis; Rigitano, 1998). O uso excessivo e inadequado de defensivos agrícolas também contribui para esse cenário, pois compromete o equilíbrio da entomofauna benéfica, reduzindo a eficácia do controle biológico natural. Outros elementos relevantes incluem a orientação das plantas em relação ao sol e as características genéticas dos genótipos utilizados como hospedeiros (Darbello, 2011).

Os ovos, com cerca de 0,3 mm, são depositados na superfície superior das folhas de café. Eles apresentam uma estrutura translúcida, de formato oval e côncavo, com as laterais expandidas (Almeida et al., 2020). Após a eclosão, as larvas eclodem da parte inferior dos ovos e penetram diretamente no mesofilo da folha, sem entrar em contato com o ambiente externo. As larvas se alojam entre as duas epidermes da folha, destruindo o parênquima e formando a "mina" (Guerreiro-Filho, 2006). As áreas danificadas começam a secar e o tamanho da região afetada aumenta à medida que as lagartas se desenvolvem e as diferentes "minas" se conectam. Essas lesões provocam necrose e redução da área foliar funcional, resultando em uma menor taxa fotossintética e consequente esgotamento da planta, o que compromete o seu desenvolvimento e leva à queda prematura das folhas (Almeida et al., 2020).

Após o estágio larval, as lagartas deixam o interior das folhas, saindo pela parte inferior, onde produzem um fio de seda e descem para o terço inferior do cafeeiro. Nesse local, é onde ocorre a transformação em pupa para a maioria das lagartas. Após completarem o estágio pupal, novas mariposas surgem, com uma longevidade média de 15 dias (Ferrão et al., 2017).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Leucoptera coffeella* (bicho-mineiro), desde o ovo até o estágio adulto. Após a eclosão, a lagarta perfura o tecido foliar e se desenvolve até formar a pupa. O inseto adulto emerge da pupa, realiza o acasalamento e, em seguida, as fêmeas ovipositem preferencialmente na face adaxial das folhas de cafeeiro, reiniciando o ciclo. Imagem adaptada de: <https://hubdocafe.cooxupe.com.br/bicho-mineiro-nas-lavouras-cafeeiras-do-sul-de-minas-gerais/>

Compreender esse ciclo é essencial para o desenvolvimento de estratégias de manejo e melhoramento genético, uma vez que a resistência do cafeeiro ao bicho-mineiro está relacionada tanto às fases larval quanto adulta do inseto (Souza; Reis; Rigitano, 1998). De maneira geral, todas as cultivares da espécie *C. arabica* são severamente atacadas pelo bicho-mineiro, com níveis de infestação que variam entre 50% e 90%. No entanto, a cultivar Siriema se destaca como uma exceção, sendo a única entre os materiais de *C. arabica* que apresenta resistência ao inseto, característica herdada de sua origem híbrida com *C. racemosa* (Guerreiro Filho; Medina Filho; Carvalho, 1991; Matiello et al., 2014). Fontes de resistência foram encontradas nas espécies *C. racemosa*, *C. congensis*, *C. liberica*, *C. stenophylla*, *C. salvatrix*, *C. brevipes*, entre outras (Medina Filho; Carvalho; DM., 1977).

Nas espécies resistentes, o desenvolvimento larval do bicho-mineiro é severamente comprometido. As lagartas geralmente morrem logo após a eclosão e o início da alimentação, o

que resulta em lesões puntiformes e quase imperceptíveis nas folhas. Por outro lado, em plantas suscetíveis, como as cultivares de *C. arabica*, as lagartas conseguem se alimentar intensamente, consumindo grandes áreas do parênquima paliçádico. Nesse caso, elas se deslocamativamente dentro do tecido foliar, formando lesões de tamanho variável (Guerreiro Filho; Mazzafera, 2000).

### 1.3 Mecanismos de defesa

As plantas, por ocuparem o primeiro nível trófico, são fontes primárias de nutrientes para uma ampla variedade de organismos, incluindo insetos herbívoros. No entanto, sua vulnerabilidade à herbivoria é atenuada por um conjunto complexo de mecanismos de defesa que foram selecionados ao longo da evolução. Esses mecanismos têm o potencial de minimizar, retardar ou até mesmo impedir o ataque de insetos, contribuindo para a sobrevivência e o sucesso reprodutivo das espécies vegetais (Baldin; Vendramin; Lourençao, 2019).

Essas defesas podem ser de natureza física — como tricomas, espinhos e cutículas espessas — ou química, incluindo a produção de metabólitos secundários com ação repelente, tóxica ou antinutricional. Além disso, as defesas vegetais podem atuar de forma isolada ou sinérgica, afetando diretamente o desempenho dos herbívoros ou favorecendo a atuação de inimigos naturais. De modo geral, esses mecanismos são classificados como constitutivos ou induzidos (Baldin; Vendramin; Lourençao, 2019).

A defesa constitutiva está presente na planta de forma contínua, sem depender de ataques externos, e engloba barreiras físicas, como estruturas mecânicas, e compostos químicos, como toxinas e inibidores de alimentação. Por outro lado, a defesa induzida é ativada em resposta à herbivoria ou oviposição. O dano causado ativa genes de resposta à defesa e leva ao redirecionamento de genes responsáveis pela manutenção celular para mecanismos de proteção da planta. Quando lesionadas, as plantas liberam elicidores que estimulam a expressão gênica e a produção de compostos químicos voláteis e não voláteis, como inibidores de proteinase, fenólicos e enzimas associadas a diferentes estratégias de defesa (Karban; Kuć, 1999). Diversas vias de sinalização, mediadas por moléculas como ácido jasmônico, ácido salicílico, etileno e ácido abscísico, regulam a ativação dessas defesas em resposta ao ataque de artrópodes (Silva; Panizzi, 2019; Smith, 2005).

A presença de herbívoros pode desencadear nas plantas defesas diretas, que interferem em seu crescimento e alimentação, ou defesas indiretas, como a liberação de compostos voláteis que atraem predadores ou parasitas desses herbívoros. Além disso, a defesa indireta pode ser fortalecida pela oferta de abrigo ou recursos alimentares alternativos para os inimigos naturais, potencializando sua eficácia no controle das populações herbívoras (Silva; Panizzi, 2019).

Na literatura sobre resistência de plantas a artrópodes, três tipos principais de resistência são frequentemente descritos como: antixenose, antibiose e tolerância (Smith, 2005). Inicialmente, esses mecanismos foram definidos por Painter (1951) e posteriormente refinados por Hober (1980), que os classificou como categorias funcionais.

O termo antixenose, derivado do grego *xeno* (hóspede), refere-se à resistência de uma planta baseada na sua incapacidade de servir como hospedeira para insetos ou outros artrópodes. Essa forma de defesa atua principalmente dificultando o reconhecimento da planta como um recurso adequado para alimentação, oviposição ou abrigo, levando a praga a buscar hospedeiros alternativos (Smith, 2005).

Entre os principais fatores associados à antixenose estão as barreiras físicas, como camadas epidérmicas espessas, presença de ceras na superfície de folhas, caules ou frutos, além da variação na densidade e estrutura dos tricomas, que podem dificultar o acesso ao tecido vegetal ou o deslocamento do inseto. Esses elementos físicos interferem diretamente no comportamento do artrópode, inibindo sua permanência ou dificultando o sucesso de seu ciclo biológico (Smith, 2005).

Além dos aspectos físicos, a composição química da planta também desempenha um papel decisivo. Plantas resistentes podem não apresentar os fitoquímicos atrativos necessários para estimular o apetite ou a oviposição dos herbívoros. Alternativamente, podem conter compostos específicos que atuam como repelentes, inibidores de alimentação ou até toxinas, que se tornam ativas após a ingestão (Smith, 2005).

Nesse contexto, Roger Whittaker (1970) introduziu o termo *aleloquímico* como uma nova denominação para substâncias vegetais secundárias, ampliando a compreensão sobre o papel desses compostos nas interações ecológicas. Ele definiu os aleloquímicos como "substâncias químicas não nutricionais produzidas por um indivíduo de uma espécie que influenciam o crescimento, a saúde, o comportamento ou a dinâmica populacional de outra espécie".

Os aleloquímicos podem atuar de diferentes formas nas interações entre plantas e artrópodes. Quando beneficiam a planta produtora, são chamados de alomônios, funcionando como repelentes, inibidores de alimentação ou oviposição. Por outro lado, quando favorecem o artrópode receptor, são denominados cairomônios, podendo atrair ou estimular o inseto em busca de recursos, enquanto os sinomônios beneficiam ambos (Smith, 2005).

A resistência vegetal do tipo antibiose ocorre quando uma planta resistente impacta negativamente a biologia de um artrópode que tenta utilizá-la como hospedeira. Os efeitos antibióticos de uma planta resistente podem variar em intensidade, indo de leves a letais, e decorrem tanto de defesas químicas quanto de características morfológicas da planta. Os efeitos letais podem ser agudos, afetando geralmente ovos e larvas jovens. Os efeitos crônicos, levam à

morte de larvas mais desenvolvidas e pré-pupas incapazes de empupar, pupas que não emergem e adultos inviáveis. Além disso, mesmo os indivíduos que sobrevivem aos efeitos diretos da antibiose podem apresentar compromimentos, como redução no tamanho e peso corporal, crescimento mais lento durante os estágios imaturos e menor capacidade reprodutiva (Smith, 2005).

De acordo com (Lara, 1991), a resistência por antibiose pode estar relacionada à presença de compostos químicos, como os alomônios, que interferem negativamente na fisiologia do inseto. Entre essas substâncias, destacam-se os metabólitos tóxicos, como alcaloides, terpenos, quinonas e glicosídeos, capazes de provocar intoxicações agudas ou crônicas; os antimetabólitos, que bloqueiam ou tornam indisponíveis nutrientes essenciais; inibidores enzimáticos, que afetam a digestão; fitohormônios, que desregulam o desenvolvimento e a metamorfose; além de compostos antigenadais, que comprometem a fertilidade. A antibiose também pode resultar de uma composição nutricional inadequada da planta para o inseto, seja por deficiência quantitativa de nutrientes, ausência de um ou mais nutrientes essenciais ou um desequilíbrio na proporção dos nutrientes necessários ao desenvolvimento do inseto.

As categorias de resistência por antibiose e antixenose frequentemente se sobrepõem, pois, diferenciá-las em experimentos pode ser um desafio. Por exemplo, se um artrópode mantido em uma planta resistente não apresenta o ganho de peso esperado em comparação com uma planta suscetível, pode-se atribuir esse efeito à presença de compostos antibióticos na planta. No entanto, a redução no ganho de peso também pode ser consequência de barreiras físicas ou químicas que dificultam a alimentação, caracterizando um efeito antixenótico. Esse obstáculo pode levar a um comportamento anormal no artrópode, resultando em uma condição fisiológica debilitada que, à primeira vista, pode ser erroneamente interpretada como um efeito de antibiose (Smith, 2005).

As plantas também podem apresentar resistência a artrópodes por meio da tolerância, que lhes permite suportar ou se recuperar dos danos causados por esses organismos, mesmo quando expostas a infestações semelhantes às de cultivares suscetíveis. Essa capacidade de tolerância está diretamente relacionada às características genéticas da planta, que lhe conferem a habilidade de compensar as perdas causadas pelos artrópodes, promovendo a regeneração dos tecidos danificados e o crescimento contínuo. Do ponto de vista agronômico, cultivares tolerantes tendem a produzir maior biomassa em comparação com cultivares suscetíveis (Smith, 2005). Segundo Strauss; Agrawal, (1999), a tolerância das plantas pode ser influenciada por cinco fatores principais: aumento da taxa de fotossíntese líquida, alta taxa de crescimento relativo, intensificação da ramificação ou perfilhamento após a liberação da dominância apical, elevados níveis de carbono armazenado nas raízes e a capacidade de redistribuir esse carbono dos órgãos subterrâneos para os brotos.

#### 1.4 Estudos realizados sobre a interação cafeeiro - *Leucoptera coffeella*

Várias hipóteses foram investigadas sobre a natureza da resistência de espécies de *Coffea*, mas até o momento nenhuma correlação foi encontrada. Como a antibiose foi confirmada em vários trabalhos como o mecanismo de resistência ao estágio larval do bicho-mineiro em *C. racemosa*, *C. stenophylla* e na cultivar Siriema (Costa et al., 2025; Guerreiro-Filho, 2006; Magalhães et al., 2010), é possível supor que tais espécies produzam substâncias químicas capazes de afetar o desenvolvimento larval do bicho-mineiro (Almeida et al., 2020) ou que abriguem fungos endofíticos que produzem substâncias tóxicas específicas contra o inseto (Saikkonen et al., 2006).

Guerreiro Filho; Mazzafera, (2000) correlacionaram o teor de cafeína em folhas de *C. arabica* cv. Catuai, *C. racemosa*, e *C. canephora* cv. Robusta com a magnitude dos ataques causados pelo inseto, uma vez que, a cafeína desempenha possível papel na proteção contra herbívoros (Nathanson, 1984).

No trabalho realizado por Guerreiro-Filho e Mazzafera (2000), a variabilidade genética do cafeeiro foi explorada para investigar a cafeína como uma possível molécula de defesa contra o bicho-mineiro. A pesquisa focou na análise do conteúdo de cafeína e na resistência das plantas a esse inseto, mas os resultados mostraram que não há correlação entre essas duas características.

Considerando que o teor médio de cafeína em *C. arabica* é de aproximadamente 8 mg/g, *C. canephora* é de 13,65 mg/g e *C. racemosa* é de 0,22 mg/g, em experimentos nos quais discos de folhas de cafeeiro foram infiltrados com soluções de cafeína, o conteúdo desse alcaloide nas folhas pode ter aumentado de duas a três vezes, chegando a quase 30 mg/g em *C. arabica* com a solução a 2%. Um aumento semelhante pode ter ocorrido também em *C. canephora*. No caso de *C. racemosa*, o teor de cafeína nos discos foliares infiltrados com a solução a 2% pode ter aumentado até 200 vezes, atingindo níveis significativos. No entanto, apesar do aumento substancial na concentração de cafeína, danos consideráveis foram observados nas folhas de *C. arabica* e *C. canephora*. Já em *C. racemosa*, não houve alteração no tipo de lesão foliar, que manteve características de resistência (Guerreiro Filho; Mazzafera, 2000).

Esses resultados não confirmam a hipótese de que a cafeína funcione como uma molécula de defesa contra o bicho-mineiro, sugerindo que a resistência do cafeeiro ao inseto pode ser atribuída a outros fatores. No entanto, os dados apresentados não são conclusivos para excluir totalmente a possibilidade de que a cafeína tenha desempenhado um papel evolutivo na defesa da planta (Guerreiro Filho; Mazzafera, 2000). Pesquisas indicam que a tolerância à cafeína em pragas do cafeeiro pode estar relacionada à ação da microbiota intestinal. Estudos com a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae), outro inseto que se alimenta de tecidos ricos em cafeína, demonstraram que a degradação desse alcaloide é mediada por bactérias simbióticas presentes em seu intestino, especialmente cepas de *Pseudomonas*. Essas bactérias são

capazes de utilizar a cafeína como única fonte de carbono e nitrogênio, possibilitando a sobrevivência do inseto em ambientes naturalmente ricos nesse composto (Ceja-Navarro et al., 2015).

Da mesma forma, Magalhães et al., (2010) investigaram as concentrações de ácido clorogênico, ácido cafeico, cafeína e seus derivados em diferentes níveis de infestação pelo bicho-mineiro. Os resultados revelaram que apenas os níveis de ácido clorogênico apresentaram tendência de queda com o aumento da infestação, embora essa redução não tenha sido estatisticamente significativa. Com base nesses dados, os autores concluíram que esses fitoquímicos não desempenham um papel determinante na resistência ou suscetibilidade das plantas ao ataque do inseto, sugerindo que outros fatores metabólicos ou ecológicos podem estar mais diretamente envolvidos na interação planta-praga.

Entretanto, quando Magalhães et al., (2008a) correlacionaram os níveis de cafeína nas folhas de café com as preferências das fêmeas de *L. coffeeella* para oviposição, diferenças significativas foram observadas. Os autores observaram uma correlação positiva entre o teor de cafeína nas folhas e a escolha das fêmeas e constataram que a cafeína desempenha um papel como mediador na interação entre hospedeiro e praga, estimulando a oviposição.

Magalhães et al., (2008b) também investigaram os compostos voláteis presentes nas folhas de diferentes genótipos de café e observaram que a preferência das fêmeas do bicho-mineiro para oviposição estava associada a altas concentrações de p-cimeno e a baixas concentrações de β-cimeno. Ambos são monoterpenos aromáticos frequentemente envolvidos em mecanismos de defesa química. O p-cimeno, em particular, é conhecido por atuar como um semioquímico em interações planta-inseto, podendo funcionar como atrativo ou repelente, dependendo do organismo alvo e da concentração (Qasim et al., 2024). Utilizando um olfatômetro, Magalhães et al., (2008b) confirmaram que o p-cimeno atua como um mediador químico da interação entre a planta e o inseto, influenciando diretamente o comportamento de escolha do hospedeiro para oviposição.

A pesquisa conduzida por Ramiro; Guerreiro-Filho; Mazzafera, (2006) investigou a contribuição dos compostos fenólicos e das enzimas oxidativas peroxidase (POD) e polifenol oxidase (PPO) na resistência do cafeeiro ao bicho-mineiro. O estudo envolveu as espécies parentais *C. arabica* e *C. racemosa*, além de seus híbridos com diferentes níveis de resistência. Entre os compostos fenólicos analisados, o ácido clorogênico — uma classe de ésteres derivados do ácido quínicico e de ácidos cinâmicos (Clifford et al., 1987) — destacou-se como um dos mais relevantes. Esse composto pode ser rapidamente oxidado pelas enzimas PPO e POD, formando a clorogenoquinona, um intermediário altamente reativo que interage com proteínas foliares, dificultando sua digestão por insetos herbívoros. Além disso, as quinonas podem ser diretamente

tóxicas aos herbívoros, e sua redução pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), com potencial para danificar nutrientes essenciais e moléculas complexas, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Felton et al., 1989).

Apesar desse potencial defensivo, os resultados indicaram que os fenóis e as enzimas oxidativas não são os principais determinantes da resistência ao bicho-mineiro. Embora *C. racemosa* tenha apresentado maior acúmulo de ácido clorogênico e atividade de PPO em resposta ao ataque, essas diferenças não foram mantidas nos híbridos resistentes, que se mostraram semelhantes à *C. arabica* suscetível em termos de conteúdo fenólico e atividade enzimática. A análise por cromatografia líquida de alta eficiência revelou perfis qualitativos semelhantes entre os híbridos e a cultivar suscetível, reforçando a hipótese de que os compostos fenólicos e as enzimas PPO e POD, isoladamente, não explicam completamente os mecanismos de resistência (Ramiro; Guerreiro-Filho; Mazzafera, 2006). Assim, embora tenham papel coadjuvante, esses fatores parecem não ser os elementos centrais na defesa direta contra *L. coffeella*, indicando a necessidade de investigar outras vias metabólicas e mecanismos constitutivos ou induzidos associados à resistência.

Alves et al., (2011) investigaram o efeito do extrato metanólico seco de folhas de *C. racemosa* quando pulverizado sobre folhas de *C. arabica* em um teste de oviposição com escolha pelo bicho-mineiro. Os resultados mostraram que as plantas tratadas com o extrato seco foram menos atraentes para a oviposição. Em seguida, os pesquisadores realizaram um teste de efeito ovicida, pulverizando mudas de *C. arabica* que continham ovos do bicho-mineiro com o mesmo extrato. Essa aplicação resultou em uma redução significativa na eclosão das lagartas, e análises realizadas por microscopia eletrônica de varredura revelaram anomalias nas superfícies externas dos ovos não viáveis. No entanto, não foram realizados estudos para isolamento e identificação das substâncias bioativas.

Um estudo conduzido por Costa et al., (2025) avaliou os tipos e níveis de resistência em plantas da progénie ‘Siriema’ ao bicho-mineiro do café. Nos ensaios de oviposição em dupla escolha, onde cada genótipo ‘Siriema’ foi comparado com a cultivar comercial Arara, constatou-se que mariposas de *L. coffeella* preferiram as folhas de ‘Siriema’ para a oviposição na maioria das comparações. Como resultado, essas progénies foram classificadas como estimulantes em relação à cultivar Arara. Além disso, as fêmeas de bicho-mineiro depositaram o dobro de ovos nas progénies ‘Siriema’ em comparação à cultivar Arara, quando analisada a média de oviposição por folha. Características como o tamanho das folhas, avaliado pelo número de ovos em folhas de 10 cm<sup>2</sup>, e a intensidade da coloração foliar, medida pelo índice relativo de clorofila, não influenciaram a preferência de oviposição do bicho-mineiro do café. Os resultados dos ensaios laboratoriais indicaram que os genótipos ‘Siriema’ não demonstram resistência por antixenose. Com base nos

resultados do ensaio sem escolha, sugere-se que as progênies resistentes de 'Siriema' apresentem um mecanismo de resistência relacionado à antibiose contra o bicho-mineiro. Essa interpretação é apoiada pela baixa sobrevivência larval observada (35,9%), além do fato de que a maioria das lesões foi classificada como pequenas, com características puntiformes e filiformes (pontuações de lesão 1 e 2). Essas classificações são indicativas de níveis altos a moderados de resistência por antibiose, respectivamente.

## 1.5 Metabólitos secundários

Na investigação de metabólitos secundários que possam contribuir para a antibiose em folhas de cafeiro resistentes ao bicho-mineiro, já foram analisados compostos como alcaloides, fenólicos totais, ácidos clorogênicos e ácido cafeico. No entanto, certas classes de metabólitos, especialmente aqueles encontrados no café e na família Rubiaceae, merecem destaque pelo seu potencial inseticida. Entre esses compostos, destacam-se ciclotídeos, diterpenos, triterpenos pentacíclicos e taninos, que podem desempenhar um papel crucial na defesa das plantas contra essa praga (Correia, 2021).

Os ciclotídeos, que são peptídeos de baixo peso molecular encontrados na família Rubiaceae, desempenham um papel importante na defesa das plantas contra insetos. Vários estudos indicam que a principal função desses compostos é proteger as plantas de ataques herbívoros. Um exemplo notável é o ciclotídeo kalata B1, cuja ingestão pode retardar o crescimento e provocar um aumento significativo na mortalidade das lagartas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Seydel et al., 2007). No entanto, no estudo realizado por Correia, (2021) com folhas de *C. racemosa*, *C. arabica* e seus híbridos interespecíficos, os cromatogramas gerados por cromatografia líquida acoplada a um detector de arranjo de fotodiodos (LC-DAD) não revelaram picos nos comprimentos de onda de 220 nm, associados a ligações peptídicas, nem em 280 nm, que são típicos de aminoácidos aromáticos, indicando a ausência de ciclotídeos.

Espécies do gênero *Coffea* acumulam diterpenos da família ent-kaurano no endosperma de suas sementes, sendo o cafestol e o kahweol os compostos mais abundantes. Esses diterpenos são armazenados principalmente na forma esterificada com ácidos graxos, especialmente o palmitato. Estudos indicam que a principal função do cafestol e do palmitato de cafestol nas plantas está relacionada à resistência contra insetos (Antoine et al., 2023; Dambolena et al., 2016). Com o objetivo de avaliar a presença e possíveis diferenças nos teores dos diterpenos cafestol, o caveol e o 16-metil-cafestol (Correia, 2021) realizou a saponificação das folhas de *C. racemosa* (R), *C. arabica* (S), híbridos resistentes e suscetíveis. Para todas as amostras analisadas somente a presença do cafestol foi detectada para as folhas não infestadas pelo bicho-mineiro.

O ácido ursólico (AU) é um triterpeno pentacíclico encontrado em folhas de café, especialmente na espécie *C. arabica*, onde pode ser encontrado em quantidades significativas. Esse composto é reconhecido por suas propriedades benéficas, incluindo atividade anti-alimentar e efeitos tóxicos sobre insetos herbívoros. Estudos indicam que o AU pode ajudar a proteger as plantas contra pragas, como o bicho-mineiro, ao inibir a oviposição e afetar o desenvolvimento dos insetos (Santos Júnior et al., 2018).

No estudo conduzido por Correia (2021), foi observada uma diferença estatisticamente significativa nos teores de ácido ursólico (AU) na cera cuticular das folhas de cafeiro ao longo do tempo, durante o experimento de infestação por *L. coffeella*. De acordo com a autora, variação temporal pode indicar que a planta pode ajustar dinamicamente a concentração desse metabólito na superfície foliar em resposta à presença da praga, funcionando como uma forma de defesa química induzida ou regulada com base no estágio de infestação.

Por outro lado, o fato de não ter sido detectada variação significativa nos teores de ácido ursólico nos tecidos internos da folha reforça a hipótese de que esse composto atua predominantemente na superfície foliar, ou seja, como uma barreira química de contato, exercendo seus efeitos principalmente na fase inicial da interação inseto-planta, quando o inseto se aproxima, pousa ou inicia a oviposição (Correia, 2021).

Os taninos são os metabólitos secundários mais abundantes nas plantas, frequentemente representando de 5% a 10% do peso seco das folhas em diversas espécies arbóreas. Esses compostos pertencem ao grupo dos compostos fenólicos e desempenham um papel crucial na defesa das folhas contra insetos herbívoros. Devido à sua natureza fenólica, os taninos apresentam alta reatividade química, o que lhes permite formar pontes de hidrogênio, tanto intra quanto intermoleculares. Essa propriedade os torna capazes de se complexar fortemente com proteínas, amido, celulose e minerais. Quando as plantas são atacadas por herbívoros, elas podem responder aumentando a produção de taninos. Essa resposta é uma estratégia de defesa que visa reduzir a palatabilidade, a preferência e a digestibilidade das folhas, tornando-as menos atrativas ou tóxicas para os insetos (Barbehenn; Peter Constabel, 2011). No trabalho realizado por Correia (2021), onde foram analisadas folhas de *C. racemosa*, *C. arabica* e seus híbridos interespécíficos resistentes e suscetíveis, foi identificada uma diferença estatística significativa nos níveis de taninos condensados entre os genótipos analisados, mesmo antes do primeiro contato com *L. coffeella*. Esse aumento sugere que esses metabólitos podem desempenhar um papel importante na antibiose.

Neste mesmo trabalho, durante a análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, foi possível identificar um alcaloide nunca relatado no gênero *Coffea*, a arecolina. A arecolina foi encontrada apenas no genótipo resistente e houve um aumento na produção durante

a infestação quando comparado às mudas que não tiveram contato com o inseto. Ao analisar a rota biossintética, observou-se um aumento significativo do alcaloide trigonelina no genótipo suscetível. Isso indica que, durante a infestação, a via metabólica dos alcaloides derivados do ácido nicotínico é direcionada para a produção de trigonelina nesse genótipo, enquanto no genótipo resistente, a produção é voltada para a arecolina (Correia, 2021).

## 1.6 Fungos entomopatogênicos

A dinâmica populacional do bicho-mineiro pode ser significativamente influenciada não apenas pelas características da planta hospedeira e pelas condições ambientais, mas também pela quantidade de inimigos naturais presentes (Almeida et al., 2020).

Os fungos entomopatogênicos têm se mostrado aliados importantes no controle biológico de pragas em diversas culturas. Alguns desses fungos já foram testados contra diferentes estágios de desenvolvimento de espécies do gênero *Leucoptera*. Por exemplo, ovos e larvas de *L. coffeella* demonstraram ser suscetíveis à infecção pelo fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) (Villacorta, 1983). A espécie *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) também foi descrita como patogênica para *Leucoptera malifoliella*, infectando as larvas do último instar quando elas deixam as minas para se transformarem em pupas (Draganova; Tomov; R. I., 1998).

A infecção de insetos por fungos entomopatogênicos inicia-se com a adesão dos esporos à superfície da cutícula, sendo este o primeiro estágio crucial no ciclo de vida desses microrganismos. O próximo estágio ocorre quando esses esporos entram em contato com o tecido do hospedeiro, germinando e iniciando a penetração cuticular. Durante esse processo, forma-se o apressório, uma estrutura especializada com função mecânica e enzimática, que se assemelha a uma “cunha de pressão” produzida na extremidade do tubo germinativo. Esse apressório secreta enzimas hidrolíticas que degradam a cutícula do inseto, permitindo ao fungo romper o tegumento e colonizar os tecidos internos do hospedeiro, levando-o à morte (Ahsan et al., 2024; Sharma; Sharma; Yadav, 2023).

Essa penetração é facilitada tanto por pressão física quanto por um arsenal enzimático composto por quitinases, proteases e lipases, que atuam de forma sinérgica. As quitinases degradam a quitina, principal componente estrutural da cutícula; as proteases rompem as proteínas da matriz cuticular; e as lipases dissolvem a camada lipídica externa, quebrando a barreira hidrofóbica protetora (Chelico; Khachatourians, 2008). Essas enzimas também estão envolvidas na assimilação de hidrocarbonetos e lipídios da cutícula, contribuindo para a nutrição do fungo e avanço da infecção (Huarte-Bonnet et al., 2018).

A invasão prossegue com o crescimento das hifas nos tecidos internos do inseto, onde continuam a liberar enzimas e toxinas que comprometem funções fisiológicas vitais. O processo também envolve interações com estruturas superficiais do hospedeiro, como epítopos celulares e carboidratos da parede celular (Wanchoo; Lewis; Keyhani, 2009).

No caso de *B. bassiana*, além da destruição tecidual direta, destaca-se a produção de metabólitos secundários com ação inseticida, como beauvericina, bassianina, bassianolida, beauverolidas, tenelina, oosporeína, ácido oxálico e cristais de oxalato de cálcio. Entre eles, a beauvericina é particularmente tóxica e importante no processo de patogênese. O mecanismo de atuação dessas toxinas varia conforme o tipo de composto e o inseto-alvo, sendo, portanto, difícil estabelecer um único modelo generalizado de toxicidade. Em geral, a mortalidade do hospedeiro resulta da combinação da ação mecânica, enzimática e tóxica promovida pelo fungo (Wang et al., 2021).

Uma questão importante é se fungos entomopatogênicos, atuam exclusivamente como parasitas obrigatórios de insetos ou se também exploram outras fontes de nutrição. Meyling e Eilenberg (2007) sugeriram que *Beauveria* e *Metarhizium* funcionam predominantemente como parasitas de insetos, mas reconhecem a possibilidade desses fungos apresentarem outros modos de nutrição. Embora o parasitismo de insetos por essas espécies seja bem documentado (Meyling; Eilenberg, 2007), existe uma crescente evidência de que eles têm uma história de vida mais flexível do que se pensava anteriormente.

A partir da análise da abundância de fungos entomopatogênicos isolados da superfície de 1.700 artrópodes capturados em florestas no oeste do Canadá, foi observado que *B. bassiana* representou cerca de um quarto de todos os isolados. Isso sugere que os entomopatógenos são componentes comuns da micobiota da superfície dos artrópodes, não estando restritos apenas a insetos doentes (Greif; Currah, 2007). Além disso, há evidências de que gêneros como *Beauveria*, *Metarhizium* e outros fungos relacionados podem atuar tanto como micoparasitas quanto endofíticos de plantas (Vega et al., 2009).

## 1.7 Interações entre fungos endofíticos e plantas

Existe uma compreensão cada vez maior sobre a relevância das interações em múltiplos níveis tróficos que determinam a relação entre plantas e herbívoros. Além disso, microrganismos intestinais podem influenciar a habilidade de um herbívooro se alimentar com êxito em uma espécie vegetal específica (Ceja-Navarro et al., 2015). Microrganismos simbiontes de plantas são reconhecidos por impedir a herbivoria de insetos em plantas hospedeiras em diversas espécies. Dessa forma, muitos sistemas de interação entre insetos herbívoros e plantas são

significativamente moldados por outras espécies que interagem nesse contexto (Cheplick; Clay, 1988).

Estudos demonstram que plantas colonizadas por microrganismos são menos atraentes e palatáveis para os herbívoros em comparação com plantas não colonizadas, o que contribui para a proteção das plantas contra insetos herbívoros em diversas espécies (Cheplick; Clay, 1988; Hartley; Gange, 2009; Resquín-Romero et al., 2016). Por exemplo, (Rabin; Pacovsky, 1985) descobriram que a soja colonizada por um fungo micorrízico resultou em menor sobrevivência e maior tempo de desenvolvimento de duas espécies de lepidópteros em comparação com a soja não micorrizada. De forma semelhante, o tabaco inoculado com uma cepa não patogênica de *Phytophthora parasitica* Dastur, 1913 (Peronosporales, Peronosporaceae) foi protegido contra ataques subsequentes de nematoides (Mcintyre; Taylor, 1978).

Há várias explicações possíveis para a redução da herbivoria em plantas infectadas. Os simbiontes microbianos heterotróficos dependem das plantas hospedeiras para sua nutrição, e plantas infectadas podem ser mais empobrecidas em nutrientes quando comparadas às não infectadas (Smith, 1985). A infecção pode também causar alterações físicas nos tecidos das plantas, tornando-as menos atraentes para os herbívoros (Webber, 1981). Além disso, sabe-se que alguns microrganismos produzem toxinas que afetam fortemente os herbívoros, mas têm efeitos limitados nas plantas hospedeiras. Tais associações podem ser mutualísticas em habitats onde as plantas estão sujeitas a forte herbivoria (Cheplick; Clay, 1988).

Os alcalóides do ergot são produzidos por fungos sistêmicos que infectam gramíneas, e podem atuar como uma defesa eficaz das plantas contra herbívoros e predadores de sementes. A maioria desses fungos é endofítico, vivendo de forma intercelular em diversos tecidos vegetais acima do solo (Clay, 1989). O termo endofítico tem sido objeto de discussões, mas geralmente é utilizado para descrever microrganismos que, durante parte ou todo o seu ciclo de vida, habitam internamente os tecidos vegetais sem causar sinais de infecção.

Fungos endofíticos foram encontrados habitando tecidos saudáveis em todas as plantas em ecossistemas naturais e representam, individual e coletivamente, um *continuum* de associações variáveis com suas plantas hospedeiras, do mutualismo à patogenicidade latente (Schulz; Boyle, 2005; Stone; Bacon; White, 2020). Assim, o termo endofítico pode incluir fungos patogênicos com um período endofítico muito curto, patógenos latentes que permanecem assintomáticos por semanas ou meses, decompõeadores que se tornam visíveis apenas quando os tecidos foliares começam a senescer e fungos que nunca se manifestam fora de seus hospedeiros (Saikkonen et al., 1998).

Os fungos endofíticos associados às gramíneas pertencem, em sua maioria, à família Clavicipitaceae (Ascomycota), sendo representados principalmente por endofíticos verdadeiros,

como os do gênero *Neotyphodium*. Esses fungos possuem grande relevância ecológica e econômica, devido à sua estreita relação com o hospedeiro e aos benefícios conferidos à planta (Schardl; Leuchtmann; Spiering, 2004). Os endofíticos verdadeiros se caracterizam por serem transmitidos verticalmente, ou seja, de uma geração para outra por meio das sementes, podendo permanecer por todo o ciclo de vida da planta sem se manifestar externamente.

De modo geral, o número de espécies de endofíticos verdadeiros por planta tende a ser reduzido (Saikkonen et al., 2004), enquanto os endofíticos transmitidos horizontalmente, que são transmitidos por meio de esporos dispersos pelo ar, podem apresentar uma diversidade muito maior (White; Backhouse, 2007). Embora a ecologia dos fungos endofíticos em plantas herbáceas e lenhosas ainda seja pouco compreendida, sabe-se que esses microrganismos pertencem majoritariamente aos filos Ascomycota e Basidiomycota (Hartley; Gange, 2009).

Os diferentes tipos de fungos endofíticos podem trazer vantagens distintas às plantas hospedeiras. Os endofíticos verdadeiros, por exemplo, são conhecidos por contribuir para a resistência das plantas contra insetos herbívoros, oferecendo proteção por meio da produção de compostos bioativos com ação defensiva (Carroll, 1988; Cheplick; Clay, 1988). Em gramíneas, a presença desses fungos tem sido associada à redução no crescimento de insetos e à menor incidência de patógenos (Arnold et al., 2003).

Um exemplo clássico é o fungo *Epichloe typhina*, produtor de alcaloides como ergolina e indol-diterpenoides. Esses compostos exercem efeitos negativos sobre organismos herbívoros. Em estudo com a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), foi observado que plantas infectadas pelo fungo apresentaram redução na sobrevivência e no desempenho das larvas, provavelmente devido à ação tóxica dos alcaloides (Cheplick; Clay, 1988).

Já nas plantas lenhosas e herbáceas em geral, a comunidade endofítica é composta principalmente por fungos não especializados, que costumam ser transmitidos horizontalmente (Higgins et al., 2007). Essa forma de colonização, por sua natureza aleatória, gera infecções variáveis e muitas vezes resulta em interações ecológicas complexas ou fracas com insetos herbívoros (Sieber, 2007). Ainda assim, muitos desses fungos têm demonstrado, em condições de cultivo, a capacidade de produzir uma ampla gama de metabólitos com propriedades antimicrobianas e inseticidas (Schulz et al., 2002).

Alguns endofíticos pertencem a gêneros que incluem fungos entomopatogênicos, como *Beauveria*. *Beauveria bassiana* foi identificada como endofítico em diversas plantas, incluindo milho (Bing; Lewis, 1993), batata (Ownley et al., 2004), algodão, tomate (Leckie, 2002), banana (Akello et al., 2007) e café (Luangsa-Ard et al., 2005; Sung et al., 2007). Esse fenômeno é corroborado pelos estudos de Vega et al. (2008b), que também isolaram *B. bassiana* em plantas de café coletadas na Colômbia, Havaí e Porto Rico, além de outros fungos entomopatogênicos, como

*Acremonium*, *Cladosporium*, *Clonostachys* e *Isaria*. Em bioensaios de laboratório, *B. bassiana* e *Clonostachys rosea* demonstraram ser eficazes no controle da broca do café, *H. hampei* (Vega et al., 2008).

Estudos que manipularam a interação entre insetos herbívoros e plantas indicaram que, quando os fungos endofíticos foram inoculados nas plantas, o desempenho dos insetos herbívoros foi reduzido. Embora não haja evidências diretas, é provável que esses efeitos sejam causados por alterações químicas no hospedeiro, considerando a tendência desses fungos em produzir uma variedade de metabólitos secundários (Schulz et al., 2002).

A redução dos danos às plantas causados por diversos insetos-praga foi observada em várias culturas após o tratamento com fungos entomopatogênicos endofíticos. Por exemplo, Quesada-Moraga; Munoz-Ledesma; Santiago-Alvarez, (2009) relataram a diminuição dos danos causados pela vespa *Iraella luteipes* (Hymenoptera: Cynipidae) em papoulas do ópio tratadas com *B. bassiana*. Além disso, a redução da formação de túneis causada pelas larvas de lepidópteros, da broca europeia do milho (*Ostrinia nubilalis* Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) e *Sesamia calamistis* Hampson (Lepidoptera: Noctuidae), também foi observada no milho tratado com fungos endofíticos (Cherry et al., 2004).

Esses estudos ressaltam como as interações entre plantas e herbívoros podem ser fortemente influenciadas por outros organismos interativos, como fungos simbióticos, destacando a complexidade das relações ecológicas e evolutivas nos sistemas planta/inseto.

## CAPÍTULO 2: ISOLAMENTO E TRIAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM *Coffea racemosa* E *Coffea stenophylla* COM POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO

### 2.1 Introdução

As plantas não são entidades autônomas em seu funcionamento e interação com o ambiente, uma vez que abrigam uma grande diversidade de microrganismos dentro e fora de seus tecidos. Juntas, plantas e microrganismos formam uma entidade única, conhecida como holobionte (Trivedi et al., 2020). Dentre esses microrganismos, os fungos endofíticos, que vivem de forma assintomática nos tecidos vegetais, vêm despertando crescente interesse na pesquisa entomopatogênica, pois estudos indicam que algumas espécies podem atuar no controle de insetos e promover benefícios às plantas hospedeiras (Vega et al., 2009). A interação entre esses fungos e seus hospedeiros pode envolver a produção de metabólitos secundários e enzimas extracelulares, essenciais na infecção e colonização de insetos-alvo (Shah; Pell, 2003).

Os fungos entomopatogênicos utilizam diversos mecanismos para infectar seus hospedeiros, incluindo a adesão dos conídios à cutícula do inseto, a germinação e penetração mediadas por enzimas como quitinases, proteases e lipases, seguidas da colonização da hemocele, resultando na morte do hospedeiro por ação mecânica e toxicológica (Ortiz-Urquiza; Keyhani, 2013). A produção dessas enzimas varia entre diferentes isolados e pode estar diretamente relacionada à sua virulência. Devido ao interesse na interação desses fungos com culturas de relevância econômica, diversas interações fúngicas endofíticas foram estudadas em espécies como trigo (Russo et al., 2015), feijão comum (Parsa et al., 2018), milho (Bing; Lewis, 1993), tomate (Qayyum et al., 2015), soja (Russo et al., 2015), papoula (Quesada-Moraga et al., 2006), mandioca (Greenfield et al., 2016), sorgo (Tefera; Vidal, 2009), algodão (Lopez; Sword, 2015) e café (Posada et al., 2007; Vega, 2008).

O gênero *Coffea* (Rubiaceae) compreende mais de 120 espécies conhecidas, sendo *Coffea arabica* e *Coffea canephora* as mais cultivadas e economicamente relevantes. *C. arabica* domina o mercado global, representando aproximadamente 60% da produção mundial de café, enquanto *C. canephora* (robusta) responde por cerca de 40% (International Coffee Organization's (IOC), 2023). Além dessas, *Coffea liberica* é cultivada em menor escala, especialmente nas Filipinas e na Malásia, embora sua participação no comércio global seja insignificante (Davis et al., 2006).

Além das espécies amplamente comercializadas, algumas variedades menos conhecidas, como *C. congensis*, *C. eugeniooides* e *C. racemosa*, também são utilizadas na produção de café. *C. racemosa*, nativa da África Oriental, é cultivada em menor escala e tem pouco impacto comercial, mas desempenha um papel importante em programas de melhoramento genético devido a

variedades que apresentam resistência a pragas e doenças. Muitas dessas espécies são exploradas localmente ou colhidas diretamente da natureza em regiões da África e Ásia (Davis et al., 2020)

Nos últimos anos, o interesse em espécies de café pouco estudadas tem aumentado, especialmente por seu potencial de conferir maior resistência a pragas e doenças e por sua resiliência em face das mudanças climáticas aceleradas (Davis et al., 2019). Entre as espécies mais promissoras, destaca-se *C. stenophylla*, encontrada na África Ocidental. Essa espécie cresce naturalmente em altitudes relativamente baixas, sugerindo uma maior adaptabilidade a condições climáticas extremas. Tanto *C. racemosa* quanto *C. stenophylla* possuem características valiosas, como resistência ampliada a pragas, doenças e estresses abióticos, tornando-se alternativas importantes para sustentabilidade da cafeicultura (Davis et al., 2019)

Embora o estudo da microbiota associada ao cafeiro ainda esteja em estágio inicial em comparação com outras culturas, tem ganhado destaque nos últimos anos, principalmente em *C. arabica* (Sousa; Filho; Mondego, 2021). Esse interesse é impulsionado pela descoberta de microrganismos com potencial para o biocontrole de doenças (Del Carmen H. Rodríguez et al., 2021) e pragas do café (Vega et al., 2008), promovendo uma produção mais sustentável e eficiente. Além disso, as espécies *C. racemosa* e *C. stenophylla* têm se mostrado fontes promissoras de microrganismos para o controle de insetos, uma vez que já foi relatado por (Guerreiro-Filho, 2006) que essas espécies apresentam resistência ao bicho-mineiro do cafeiro. Isso sugere que a microbiota associada a essas plantas pode desempenhar um papel fundamental na proteção contra essa e outras pragas, abrindo novas possibilidades para estratégias de manejo integrado na cafeicultura.

Dessa forma, este estudo teve como objetivo isolar fungos endofíticos das folhas de *C. racemosa* e *C. stenophylla*, além de avaliar seu potencial entomopatogênico e a produção de enzimas extracelulares relacionadas à virulência.

## 2.2 Material e Métodos

### 2.2.1 Isolamento de fungos endofíticos

No banco de germoplasma de café do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), foram coletadas folhas sem sinais de infestação do bicho-mineiro dos genótipos *C. racemosa* e *C. stenophylla*. Informações sobre a resistência dessas plantas contra o bicho-mineiro já foram publicadas por Guerreiro-Filho, (2006). As folhas foram coletadas de forma aleatória do terço médio de cada indivíduo, escolhendo-se apenas as folhas pertencentes ao 3º ou 4º par de folhas de cada ramo. A coleta das folhas foi realizada em março/2023 e enviadas ao Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) onde foram delicadamente lavadas com água e limpas com papel toalha.

Para o isolamento dos fungos, as folhas foram cortadas em fragmentos de 5 x 5 mm e desinfetadas conforme o seguinte procedimento: imersão em álcool 70% por 1 minuto, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% de Cl<sup>-</sup> ativo por 3 minutos, nova imersão em álcool 70% por 30 segundos e, por fim, enxágue em água destilada esterilizada duas vezes. Após a desinfestação, os fragmentos foram colocados sobre papel filtro esterilizado para secagem (Araújo et al., 2014).

Cinco fragmentos foram então, adicionados em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) a 20% suplementado com estreptomicina (0,1 g/L) e incubados em BOD a 25 °C. Para cada espécie foram preparadas cinco placas de Petri, totalizando 75 fragmentos por espécie. Qualquer crescimento fúngico observado foi subcultivado em placas individuais contendo meio BDA a 20%, suplementado com antibióticos para posterior teste com insetos.

#### 2.2.2 *Triagem de fungos endofíticos com potencial entomopatogênico*

Larvas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) criadas no Laboratório de Entomologia da UFU/Monte Carmelo de acordo com metodologia de (Potrich. T.D.; Lorini; Voss, M.; Steffens, M. C. S.; Pavani, 2007), foram utilizadas em bioensaios para testar a patogenicidade e virulência de fungos endofíticos isolados a partir de *C. racemosa* e *C. stenophylla* a fim de selecionar fungos com efeitos de mortalidade sobre os insetos. O fungo *Beauveria bassiana* IIBC 66 foi utilizado como controle positivo e o caldo Batata Dextrose (BD) esterilizado foi utilizado como controle negativo.

Inicialmente, os fungos foram crescidos em BDA a 20% por sete dias e, em seguida, inoculados em meio líquido BD 20% sob agitação de 150 rpm a 25 °C. Após 10 dias de incubação foram utilizados no bioensaio com larvas de tenébrios. Este experimento foi conduzido em duas etapas

Na primeira etapa, com o objetivo de realizar um screening preliminar para avaliar o potencial entomopatogênico dos isolados fúngicos, o experimento foi realizado com duas repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri contendo 10 larvas, totalizando 20 larvas por tratamento. A inoculação foi realizada imergindo as larvas em suspensão contendo fungo por 3 segundos e colocando-as em placas com duas folhas de papel filtro. Em seguida, um fragmento de massa micelial, com aproximadamente 10 mm, foi retirado do meio líquido de crescimento do fungo e inoculado na placa onde se encontravam as larvas. Por fim, foram dispensados 1,5 mL da suspensão fúngica diretamente sobre essas mesmas larvas. A mortalidade das larvas foi avaliada ao longo de um período de 14 dias.

Na segunda etapa do experimento, foram selecionados apenas os isolados que apresentaram taxas de mortalidade entre 40% e 80% na triagem inicial. Para essa nova rodada de

testes, cada tratamento foi conduzido com três repetições, sendo cada repetição composta por 10 larvas, totalizando 30 larvas por tratamento. Diferentemente da primeira etapa, o tempo de avaliação foi reduzido para cinco dias, com o objetivo de observar de forma mais rápida a eficácia dos isolados previamente selecionados.

A aplicação conjunta dos três métodos de inoculação forneceu propágulos do fungo e, ao mesmo tempo, metabólitos secundários. As larvas utilizadas no controle foram tratadas com BD esterilizado. As larvas tratadas foram mantidas em temperatura ambiente (25°C) por cinco dias. O experimento foi estabelecido em delineamento inteiramente casualizado.

### 2.2.3 Avaliação do mecanismo de ação

O isolado fúngico S7-23 foi utilizado para avaliar o mecanismo de ação na mortalidade de *T. molitor*. Inicialmente, o fungo foi crescido em BDA a 20% e, em seguida, inoculado em meio líquido BD a 20% sob agitação de 150 rpm a 25°C por 10 dias de incubação. O fungo *B. bassiana* IBCB 66 foi utilizado como controle positivo.

Após o crescimento fúngico, utilizou-se um sistema de filtração de vidro acoplado a uma bomba a vácuo, equipado com uma membrana filtrante de 25 micrômetros, para separar a biomassa micelial da fração líquida do meio de cultura. O micélio ficou reservado em um recipiente estéril para posterior utilização. Em seguida, 30 mL do meio de cultura contendo conídios submersos e metabólitos produzidos pelo fungo foram submetidos a uma nova etapa de filtração, utilizando uma seringa com membrana de 0,2 micrômetros, com o objetivo de isolar apenas os metabólitos fúngicos. Além disso, 30 mL do meio contendo metabólitos e conídios, foram centrifugados a 4.500 rpm por 5 min a 16°C visando a separação dos conídios. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* ressuspensos em solução salina 0,9% com Tween 80 0,01% (vol/vol). Este procedimento foi realizado uma vez para remover qualquer meio residual. Os conídios submersos foram quantificados usando câmara de Neubauer sob um microscópio óptico com ampliação de 100× (Lima et al., 2024).

Com o objetivo de identificar o principal mecanismo de ação envolvido na mortalidade do inseto — seja por conídios, micélio, metabólitos ou pela interação entre esses fatores — os testes foram conduzidos de forma a expor os insetos a diferentes propágulos fúngicos por vias distintas. Essa abordagem permitiu avaliar, de maneira isolada e combinada, os efeitos de cada componente do fungo sobre o hospedeiro. Para isso, os tratamentos foram cuidadosamente planejados para simular distintas estratégias de contato entre o fungo e o inseto, da seguinte forma:

- a) Adição de micélio em placas de Petri com tenébrios.
- b) Aplicação de 1,5 mL dos metabólitos fúngicos sobre os tenébrios em placas de Peri com papel filtro.

- c) Submersão das larvas de tenébrios nos metabólitos por 3 segundos, seguida pela transferência para placas de Petri forradas com papéis filtro de celulose.
- d) Aplicação de 1,5 mL de suspensão de conídios sobre os tenébrios em placas de Peri com papel filtro de celulose.
- e) Submersão de larvas de tenébrios na suspensão de conídios por 3 segundos e posterior transferência para placas de Petri forradas com papéis filtro de celulose.

Em cada tratamento foram realizadas quatro repetições. Cada repetição foi composta por uma placa de Petri de 9 cm contendo 10 larvas de tenébrio. Os controles consistiram em caldo BD e solução salina 0,9% com Tween 80 a 0,01%, nos quais as larvas foram submersas ou aos quais foram aplicados 1,5 mL sobre as larvas. Desta forma, foram realizados nove tratamentos, com 4 repetições, totalizando 36 parcelas.

#### 2.2.4 *Avaliação da atividade lipolítica do isolado S7-23*

A atividade lipolítica foi determinada pela detecção de lipase empregando-se o meio lipase/esterase com Tween 20. A presença de halos formados por cristais indica a produção de lipase. O meio de cultura foi preparado adicionando-se: peptona 10g, NaCl 5g, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,1 g e ágar 20 g em 990 mL de água destilada. Ao meio, foi adicionado 1% (v/v) de Tween-20. O pH foi ajustado para 7,4 e o meio foi autoclavado por 20 min (Gopinath; Anbu; Hilda, 2005).

Inicialmente, o isolado fúngico S7-23 foi cultivado por sete dias em meio BDA para garantir o crescimento adequado e a produção de biomassa. Cerca de 20 mL do meio lipase foram distribuídos em placas de Petri, nas quais foi inoculado, ao centro, um disco de 5 mm contendo massa micelial do isolado S7-23. Após sete dias de crescimento, a atividade lipolítica foi avaliada observando a presença ou ausência de um precipitado visível, resultante da deposição de cristais do sal de cálcio formados pelo ácido graxo liberado pela enzima, ou pelo clareamento desse precipitado ao redor da colônia devido à degradação completa do sal do ácido graxo.

A cepa IBCB 66 de *Beauveria bassiana* também foi avaliada neste experimento. Para cada isolado fúngico foram realizadas quatro repetições. Os fungos foram cultivados em câmara do tipo BOD, sob fotoperíodo, a uma temperatura constante de 28 °C.

#### 2.2.5 *Avaliação da atividade proteolítica do isolado S7-23*

Para avaliação da atividade proteolítica, foi utilizado o meio de detecção de protease: triptona 5,0 g, extrato de levedura 2,5 g, glicose 1,0 g, NaCl 2,5 g, ágar 15 g e 900 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 7,0. O meio de cultura foi esterilizado separadamente do leite, a fim de evitar a coagulação e caramelização dos seus componentes, e posteriormente 100 mL de leite desnatado foi adicionado ao meio sob condições assépticas (Araújo et al., 2014).

O meio preparado foi vertido em placas de Petri, sendo 20 mL por placa. Um disco de 5 mm do isolado S7-23 foi inoculado na superfície do meio e mantido à 28 °C por 5 dias. Após esse período, a produção de protease foi avaliada observando a formação de um halo ao redor das colônias indicando a hidrólise da proteína (Thirunavukarasu et al., 2017). A cepa IBCB 66 de *Beauveria bassiana* também foi avaliada neste experimento. Para cada isolado fúngico foram realizadas quatro repetições. Os fungos foram cultivados em câmara do tipo BOD, sob fotoperíodo, a uma temperatura constante de 28 °C.

#### 2.2.6 Avaliação da atividade da enzima quitinase

##### Preparação de quitina coloidal

A partir da quitina comercial, a quitina coloidal foi preparada seguindo o método de (Roberts; Selitrennikoff, 1988).

- Cinco gramas de pó de quitina (Sigma) foram cuidadosamente adicionados a 60 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado, sob agitação constante (150 rpm) em agitador tipo shaker e mantidas a 4 °C durante a noite para promover a hidrólise parcial do polímero.
- Em seguida, foi adicionado 1 L de etanol gelado (95%) à mistura, que foi homogeneizada por 10 minutos sob agitação a 150 rpm e posteriormente deixada em repouso à temperatura ambiente (25 °C) durante a noite, a fim de permitir a precipitação dos componentes solúveis.
- O precipitado foi coletado por centrifugação a 5.000 rpm por 20 min a 4°C e lavado com água destilada estéril até que a quitina coloidal se tornou neutra (pH 7,0).
- A quitina coloidal foi coletada e armazenada a 4°C até ser utilizada.

##### Ensaio qualitativo da enzima quitinase

O meio de detecção de quitinase consiste em um meio basal composto por litro de:

- 0,3 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O
- 3,0 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 2,0 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 1,0 g de ácido cítrico monohidratado
- 15 g de ágar
- 200 µl de Tween-80
- 4,5 g de quitina coloidal
- 0,15 g de púrpura de bromocresol.

O pH foi ajustado para 4,7 e depois autoclavado a 121°C por 15 minutos.

O meio morno foi vertido em placas de Petri e deixado para solidificar. Um disco micelial com 5 mm de diâmetro foi retirado do isolado S7-23, com 7 dias de cultivo em BDA, e inoculado no meio contendo quitina, sendo incubado a 28°C.

As placas de ágar com quitina, inoculadas com os isolados quitinolíticos, promoverão a degradação da quitina em N-acetilglucosamina, resultando em uma alteração do pH em direção à alcalinidade. Essa mudança ocasionará a alteração na cor do indicador de pH (roxo de bromocresol), que passará de amarelo para roxo, formando um halo ao redor da colônia na região onde a quitina foi utilizada (Moka; Singh; Buttar, 2021). A cepa IBCB 66 de *B. bassiana* também foi avaliada neste experimento.

#### 2.2.7 *Caracterização molecular do isolado fúngico*

##### **Extração de DNA**

O isolado S7-23 foi cultivado em meio de cultura BDA e incubado em BOD a 25 °C por 7 dias. A extração de DNA do isolado S7-23 seguiu um protocolo baseado no método descrito por (Doyle; Doyle, 1987), com adaptações para fungos filamentosos. Inicialmente, aproximadamente, 30 mg de micélio foi transferida para um microtubo Eppendorf de 1,5 mL e a maceração foi realizada com um pistilo previamente resfriado, assegurando a completa desagregação do material celular (White et al., 1990).

Após a maceração, foram adicionados 200 µL de *Nuclei Lysis Solution* (Promega, Madison, WI, EUA) e a homogeneização do material foi continuada. Em seguida, mais 400 µL da mesma solução foram incorporados ao tubo contendo o extrato celular, seguido de agitação em vórtex por 15 segundos para garantir a completa dispersão dos componentes celulares. O material foi então incubado a 65°C por 20 minutos para lise celular e liberação do DNA genômico, conforme descrito por (Sambrook; Russell, 2001). Após esse período, a amostra foi rapidamente resfriada a -20°C por 5 minutos para facilitar a precipitação de proteínas.

Para a precipitação de proteínas, adicionou-se 200 µL de *Protein Precipitation Solution* (Promega), seguido de agitação em vórtex em alta velocidade por 20 segundos. A amostra foi então centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos, permitindo a separação do sobrenadante contendo o DNA. Cerca de 400 µL desse sobrenadante foram cuidadosamente transferidos para um novo microtubo de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 600 µL de isopropanol gelado para precipitação do DNA. A solução foi homogeneizada por inversão suave do tubo e incubada a -20°C por 2 horas (Ausubel et al., 2003).

Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com 600 µL de etanol 70% resfriado. Para garantir a completa remoção de impurezas, os tubos foram invertidos repetidamente por

pelo menos 2 minutos e novamente centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos (Sambrook & Russell, 2001). O etanol foi cuidadosamente removido e os tubos foram deixados abertos na posição horizontal sobre papel toalha estéril por aproximadamente 1 hora para completa evaporação do solvente.

O DNA foi ressuspensos com a adição de 50 µL de *DNA Rehydration Solution* (Promega) e 2 µL de *RNAase Solution* para a remoção de RNA contaminante. O DNA extraído foi armazenado a -20°C para posterior utilização em análises moleculares.

### **Amplificação e sequenciamento de DNA**

A identificação a nível de gênero do isolado S7-23 foi realizada mediante sequenciamento da região ITS utilizando-se os oligonucleotídeos universais ITS1/ITS4 (Hillis; Dixon, 1991; White et al., 1990). As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25 µL, contendo 0,5 de dNTP; 0,3 µL de Taq DNA polimerase; 1,25 µL de cada primer (10 µM); 2,5 de tampão; 18,2 de água ultrapura e 1,0 µL de DNA (10 ng/µL). Para a amplificação foi montado o ciclo de: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1min e 30 s, amplificação a 52 °C por 2 min e elongação a 72 °C durante 3 min, sendo finalizada com uma elongação a 72 °C por 10 min. As amplificações foram realizadas em termociclador e os produtos da PCR separados em gel de agarose 1,2 % a 100 V. Para confirmar o tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o padrão de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder 100 PB (Ludwig biotecnologia).

Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta em um foto documentador. Em seguida, os fragmentos de tamanho esperado foram purificados usando-se *Exosap-IT* (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

O sequenciamento do produto da PCR purificado foi secado e enviados para sequenciamento pela empresa ACTGene Análises Moleculares, usando os mesmos primers utilizados na amplificação do DNA. As sequências foram analisadas e editadas usando-se o programa SeqAssem ([https://www.sequentix.de/software\\_seqassem.php](https://www.sequentix.de/software_seqassem.php)) e posteriormente comparadas com outras sequências disponíveis no National Center for Biotechnology Information – NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com o programa Blastn (Altschul et al., 1997).

## **2.3 Resultados**

### **2.3.1 Isolamento e seleção de fungos endofíticos de *Coffea* e avaliação de seu potencial como agentes de biocontrole de insetos**

Um total de 65 fungos endofíticos foi isolado das folhas de *Coffea*, sendo seis provenientes de *C. racemosa* e 59 de *C. stenophylla*. Todos os fungos isolados foram avaliados em testes de patogenicidade contra larvas de *T. molitor*, com o objetivo de identificar aqueles com potencial para atuar como entomopatogênicos.

Dentre os fungos isolados, um isolado proveniente de folhas de *C. racemosa* causou 45% de mortalidade em larvas de *T. molitor* 14 dias após a inoculação. Quanto aos isolados de *C. stenophylla*, dez causaram mortalidade variando entre 40% e 80%. Especificamente, um isolado provocou 80% de mortalidade, dois causaram 75%, três resultaram em 70%, cinco em 65%, três em 55%, sete em 45%, e, por fim, três causaram 40% de mortalidade nas larvas de *T. molitor* após o mesmo período (Tabela 1).

**Tabela 1.** Larvas de *T. molitor* mortas por cada isolado após 14 dias de exposição. Cada tratamento foi conduzido com duas repetições, totalizando 20 larvas por tratamento.

<b>Isolado</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>Porcentagem de mortalidade</b>
R2-1	1,5	15
R2-8	0,5	5
R5-7	0,5	5
R8-1	0,5	5
R8-7	1,5	15
R8-12	4,5	45
S3-1	2,0	20
S3-2	1,5	15
S3-4	4,0	40
S3-7	7,5	75
S3-9	6,5	65
S3-11	3,0	30
S3-12	4,5	45
S3-13	4,5	45
S3-14	3,0	30
S3-15	5,5	55
S3-16	6,5	65
S3-17	5,0	50
S3-19	6,0	60
S3-22	5,0	50

<i>S3-24</i>	5,5	0,7	55
<i>S3-26</i>	5,5	0,7	55
<i>S3-30</i>	4,5	3,5	45
<i>S3-31</i>	6,5	0,7	65
<i>S7-1</i>	0,5	0,7	5
<i>S7-2</i>	1,0	1,4	10
<i>S7-3</i>	1,5	2,1	15
<i>S7-4</i>	2,0	0,0	20
<i>S7-5</i>	5,0	1,4	50
<i>S7-6</i>	4,0	4,2	40
<i>S7-7</i>	8,0	1,4	80
<i>S7-8</i>	4,5	6,4	45
<i>S7-9</i>	4,5	0,7	45
<i>S7-10</i>	5,5	6,4	55
<i>S7-11</i>	1,5	2,1	15
<i>S7-12</i>	3,0	1,4	30
<i>S7-13</i>	6,5	3,5	65
<i>S7-14</i>	0,0	0,0	0
<i>S7-15</i>	6,0	0,0	60
<i>S7-16</i>	3,0	4,2	30
<i>S7-17</i>	7,5	0,7	75
<i>S7-20</i>	2,0	2,8	20
<i>S7-21</i>	2,5	3,5	25
<i>S7-22</i>	2,0	1,4	20
<i>S7-23</i>	7,0	1,4	70
<i>S7-24</i>	2,5	0,7	25
<i>S7-27</i>	7,0	0,0	70
<i>S7-28</i>	4,5	6,4	45
<i>S7-29</i>	0,0	0,0	0
<i>S7-30</i>	6,5	4,9	65
<i>S7-31</i>	4,0	0,0	40
<i>S7-32</i>	0,0	0,0	0
<i>S7-33</i>	7,0	1,4	70
<i>S7-34</i>	0,0	0,0	0
<i>S9-1</i>	0,5	0,7	5

<i>S9-5</i>	0,5	0,7	5
<i>S9-7</i>	0,5	0,7	5
<i>S9-9</i>	0,5	0,7	5
<i>S9-21</i>	0,5	0,7	5
<i>S9-17</i>	1,5	0,7	15
<i>S9-19</i>	2,5	3,5	25
<i>S9-20</i>	1,5	0,7	15
<i>S9-22</i>	1,0	0,0	10
<i>S9-23</i>	0,5	0,7	5
<i>S9-24</i>	2,5	0,7	25
<i>Controle</i>	0,0	0,0	0

Todos os isolados que causaram mortalidade foram avaliados novamente, com um período de observação de cinco dias. A cepa IBCB 66 de *B. bassiana* foi utilizada como controle positivo. Os resultados mostraram que, após o período estipulado, apenas o isolado S7-23, proveniente de *C. stenophylla*, continuou a provocar 70% de mortalidade, mesmo com a redução do tempo, enquanto os demais isolados causaram mortalidade inferior a 40%. A cepa IBCB 66 de *B. bassiana*, por sua vez, foi responsável por 100% de mortalidade em apenas três dias. Nenhuma mortalidade foi observada no grupo controle (Figura 1).





Figura 1: Bioensaio para testar a virulência do isolado S7-23. Fungo *Beauveria bassiana* IBCB 66 utilizado como controle positivo e o caldo Batata Dextrose (BD) esterilizado foi utilizado como controle negativo.

Na busca para compreender o mecanismo utilizado pelo fungo S7-23 para causar mortalidade nas larvas de tenébrios, foram realizados bioensaios para avaliar a ação inseticida de conídios submersos, micélio e metabólitos, aplicados separadamente de duas formas diferentes, conforme descrito na metodologia. A cepa IBCB 66 de *B. bassiana* também foi utilizada como referência para comparar os mecanismos de ação.

Para o isolado S7-23, a aplicação individual de conídios na concentração  $4,3 \times 10^5$  UFC/mL, micélio ou metabólitos não apresentou eficácia. No entanto, a combinação dos metabólitos com os conídios e o micélio resultou em um efeito significativo, alcançando 70% de mortalidade, o que sugere uma possível sinergia entre esses componentes (Tabela 2).

**Tabela 2.** Larvas de *T. molitor* mortas após cinco dias de exposição aos diferentes tratamentos fúngicos. Cada tratamento foi conduzido com quatro repetições, totalizando 40 larvas por tratamento.

Isolado/Tratamento	S7-23 (% de mortalidade)	IBCB 66
Aplicação dos três métodos	70	100
Massa micelial	5	2,5
Suspensão de conídios aplicados sobre as larvas	5	7,5
Larvas mergulhadas na suspensão de conídios	5	0
Metabólitos aplicados sobre as larvas	5	0
Larvas mergulhadas na solução de metabólitos	0	2,5
Salina com Tween 80	0	0
Caldo Batata Dextrose	0	0

Na avaliação de *B. bassiana* IBCB 66, a combinação dos três métodos resultou em 100% de mortalidade em apenas três dias. Quando aplicados separadamente, apenas a inoculação de conídios na concentração de  $3,2 \times 10^5$  UFC/mL atingiu 90% de mortalidade; no entanto, essa taxa foi observada apenas 10 dias após a aplicação. Os demais métodos, quando aplicados individualmente, não causaram mortalidade, mesmo no tratamento em que as larvas foram mergulhadas na suspensão de conídios na mesma concentração.

No entanto, os efeitos dos dois isolados diferiram quanto à esporulação externa. Enquanto o isolado IBCB 66 demonstrou esporulação visível sobre os corpos das larvas mortas, evidenciando o desenvolvimento micelial típico do fungo entomopatogênico, as larvas tratadas com o isolado S7-23 apresentaram mortalidade sem sinais externos de micose ou esporulação, sugerindo um possível mecanismo de ação diferente, possivelmente mediado por metabólitos ou ação sistêmica. Essas observações estão ilustradas na Figura 2.

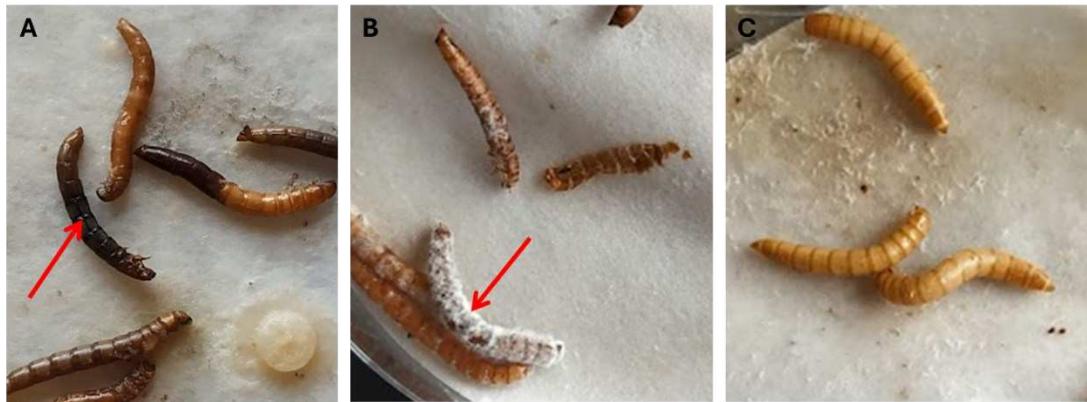


Figura 2. Larvas de *T. molitor* submetidas aos tratamentos com o isolado S7-23, *B. bassiana* (IBCB 66) e controle. A) Seta: larva morta após exposição ao fungo S7-23. Ausência de sinais externos de micose ou esporulação visível. B) Seta: Larva morta por infecção de *B. bassiana* (IBCB 66), com esporulação visível sobre a superfície do corpo. C) Controle.

Além da avaliação da virulência, o isolado S7-23 e *B. bassiana* (IBCB 66) foram analisados quanto à sua capacidade de produzir enzimas extracelulares, como quitinases, lipases e proteases, como parte de seus mecanismos de defesa contra outros organismos.

### 2.3.2 Avaliação da atividade proteolítica

Para detectar a atividade proteolítica, foram realizados ensaios em placas de ágar suplementadas com um substrato proteico, como leite desnatado. Nos testes, *B. bassiana* apresentou uma zona clara ao redor da colônia cinco dias após a inoculação no meio de cultura, evidenciando a produção de proteases (Figura 3) e a consequente hidrólise das proteínas do meio. Esse resultado indica a capacidade do fungo de degradar proteínas, possivelmente auxiliando no processo de infecção. No entanto, o mesmo padrão não foi observado para o isolado S7-23, sugerindo que sua virulência pode estar associada a outros fatores (Figura 2).

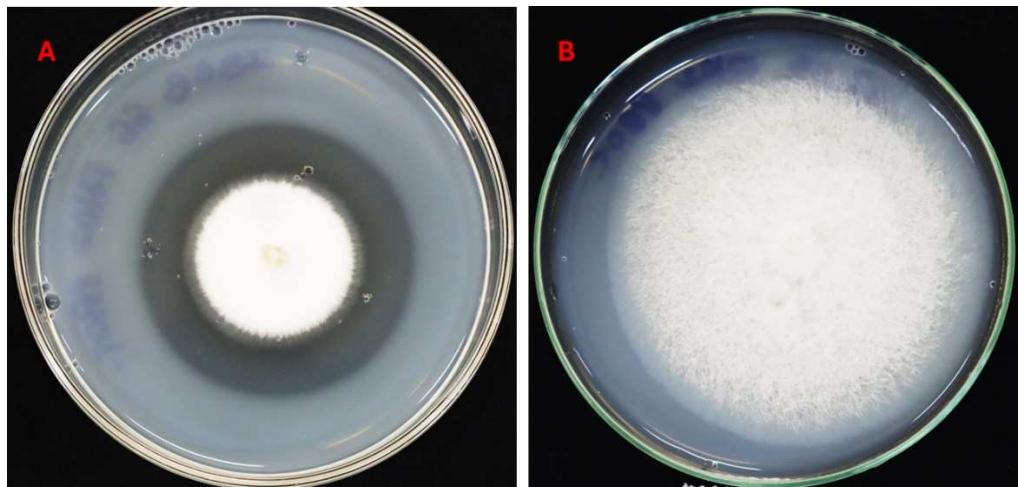


Figura 3. Avaliação qualitativa de protease em meio suplementado com leite desnatado após incubação por cinco dias a 28 °C: A) formação de halo ao redor da colônia de *Beauveria bassiana* cepa IBCB 66. B) Ausência da formação de halo ao redor da colônia do isolado S7-23.

#### 2.3.3 Avaliação da atividade lipolítica

Para avaliar a produção de lipase pelos isolados S7-23 e *B. bassiana*, foi preparado um meio de cultivo contendo peptona, sais e Tween-20 como principal indutor da produção de lipase microbiana. Os resultados mostraram que, nas condições experimentais avaliadas, *B. bassiana* apresentou atividade lipolítica, evidenciada pela deposição de cristais de sal de cálcio formados a partir dos ácidos graxos liberados pela ação enzimática. Por outro lado, nenhuma atividade foi detectada para o isolado S7-23 (Figura 4), sugerindo que esse fungo pode não produzir lipases em quantidades detectáveis nesse meio ou que a expressão dessa enzima dependa de condições ambientais específicas.

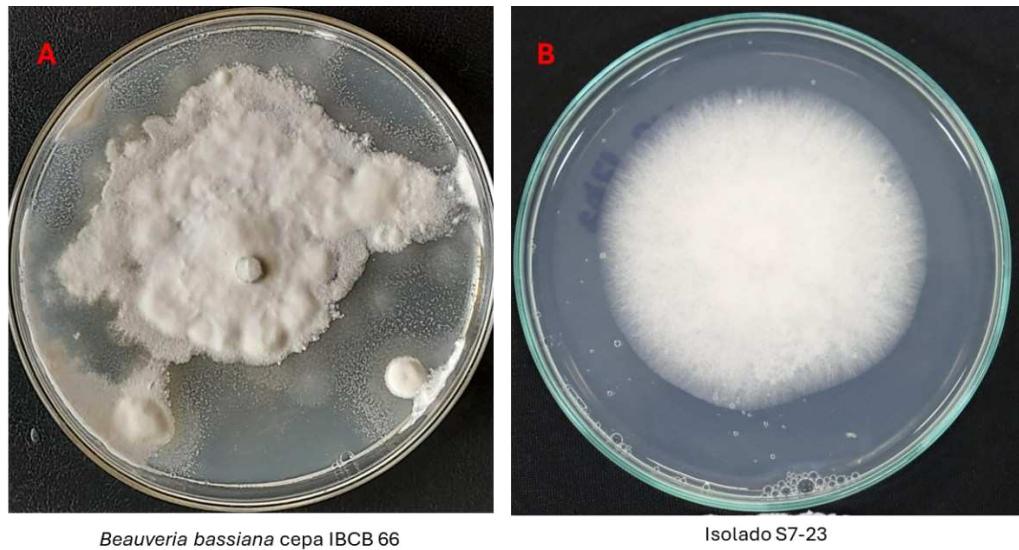


Figura 4. Avaliação qualitativa de lipase em meio com Tween-20 após incubação por cinco dias a 28 °C: A e B) Ausência de atividade lipolítica.

#### 2.3.4 Avaliação da atividade quitinolítica

Para determinar a atividade da quitinase, utilizou-se quitina coloidal, que foi preparada a partir de quitina comercial. Essa etapa foi fundamental para a seleção de isolados quitinolíticos. Os resultados dos testes indicaram que os isolados S7-23 e IBCB 66 apresentaram atividade quitinolítica no meio de cultura com quitina coloidal (Figura 5 e 6), evidenciada pela alteração do pH em direção à alcalinidade e pela mudança na coloração do indicador de pH (roxo de bromocresol).

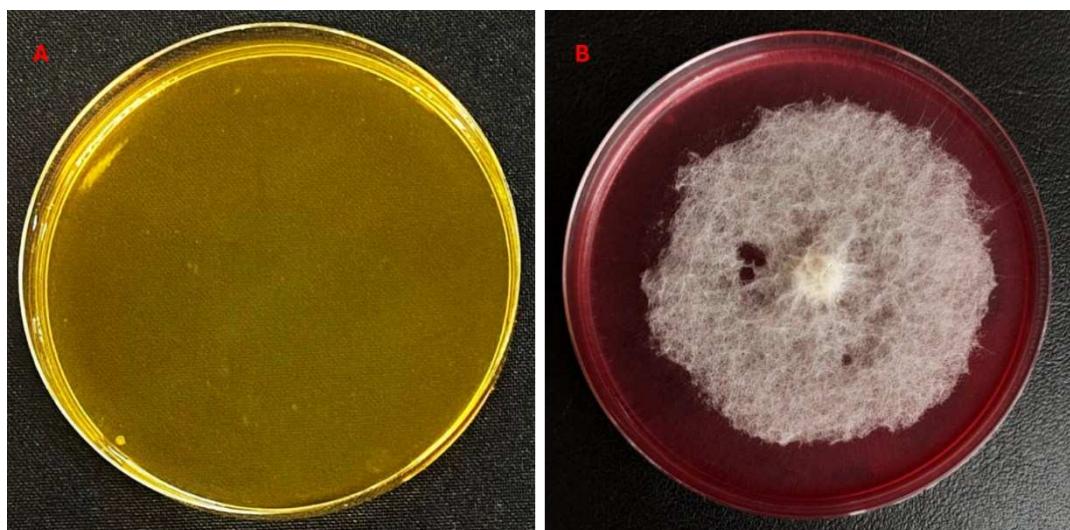


Figura 5. Atividade quitinolítica em meio suplementado com quitina coloidal. A) Controle com meio de cultura não inoculado. 2) Isolado S7-23 alta atividade de quitinase após 10 dias de incubação.

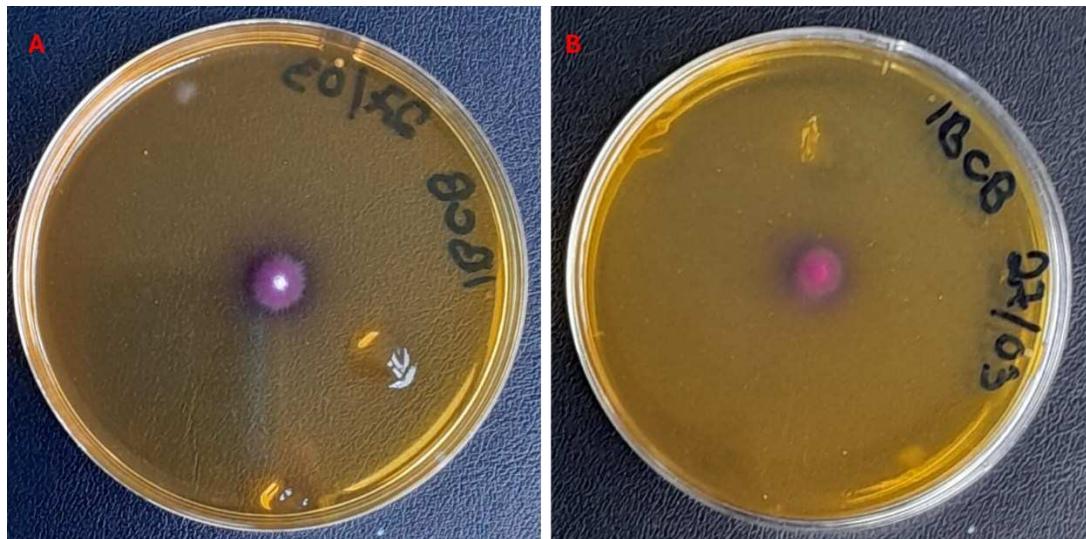


Figura 6. Atividade quitinolítica em meio suplementado com quitina coloidal. A) *B. bassiana* IBCB 66 com baixa atividade de quitinase após 4 dias de incubação. B) Reverso da cultura.

#### 2.3.5 Identificação do fungo endofítico isolado de *Coffea stenophylla*

As características morfológicas do isolado S7-23, incluindo colônia, hifas, conídios e conidióforos, foram analisadas por meio de microscópio óptico. Em meio BDA, as colônias do isolado S7-23 inicialmente exibiram uma coloração branca enquanto uma tonalidade alaranjada surgiu próxima ao ponto de inóculo (Figura 7). A margem apresentou-se regular e bem definida. A formação de conídios foi observada quando o isolado foi cultivado em meio líquido BD a 20% e em ágar aveia (Oat Meal Agar) (Figura 8).



Figura 7: Morfologia e características culturais de *Colletotrichum* isolado de *C. stenophylla*. Superior (A) e reverso (B) da cultura em BDA 7 dias após a inoculação.

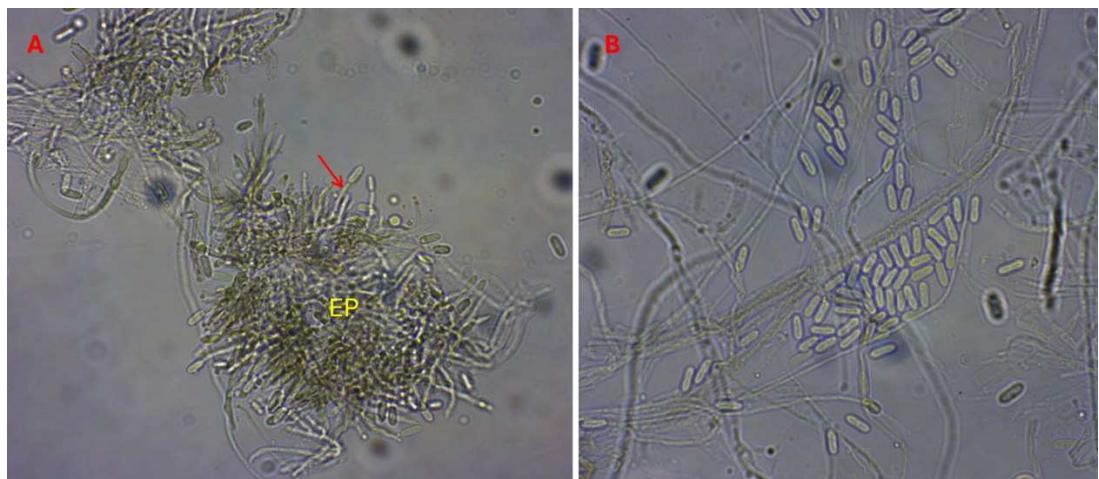


Figura 8: A) Conidióforos hialinos (seta) agrupados em esporodóquio (EP). B) Conídios.

Com base na morfologia da colônia e dos conídios, caracterizados por seu tamanho e formato observados, suspeitou-se que o isolado pertencesse ao gênero *Colletotrichum*. No entanto, a taxonomia tradicional baseada principalmente em características como tamanho e forma dos conídios, aspectos da colônia e associação com o hospedeiro nem sempre são suficientes para a identificação precisa das espécies. Assim, a utilização combinada de ferramentas de diagnóstico molecular e técnicas morfológicas tradicionais representa uma abordagem confiável para o estudo dos complexos de espécies de *Colletotrichum*. Para confirmar a hipótese inicial, foi realizada a extração de DNA do isolado, seguida de amplificação e sequenciamento da região ITS. A análise de similaridade por BLAST confirmou sua classificação dentro do gênero *Colletotrichum*, apresentando 100% de identidade com *Colletotrichum* sp. ao longo de um fragmento de 500 pares de base.

## 2.4 Discussão

Assim como os seres humanos as plantas abrigam uma ampla diversidade microbiana interna, conhecida como microbioma vegetal, cujo papel ainda está sendo desvendado (Van der Heijden; Hartmann, 2016). Na prática, uma planta pode ser vista como um conglomerado de genes vegetais e microbianos. A identificação de endofíticos em culturas agrícolas tem sido fundamental para revelar a presença de novas espécies de fungos (Peterson et al., 2005) e metabólitos fúngicos com potenciais aplicações biotecnológicas (Suryanarayanan, 2013).

Entre os fungos endofíticos mais frequentemente encontrados, *Colletotrichum Corda, 1831* (*Glomerellales, Glomerellaceae*) se destaca por sua ampla distribuição em plantas de regiões tropicais (Huang et al., 2008; Peng et al., 2013; Photita et al., 2005). Estudos anteriores confirmaram sua predominância em *C. arabica* (Oliveira et al., 2014) e em sete outras espécies do

gênero *Coffea*, incluindo *C. canephora*, *C. congensis*, *C. liberica*, *C. macrocarpa*, *C. racemosa* e *C. stenophylla* (Vega et al., 2010). Da mesma forma, (Santamaría; Bayman, 2005) identificaram *Colletotrichum* como um dos endofíticos mais frequentes em *C. arabica*.

Embora o gênero *Colletotrichum* esteja amplamente associado a doenças em plantas, ocupando a oitava posição no ranking global de fungos fitopatogênicos (Faria; Inácio, 2023), algumas espécies demonstram potencial entomopatogênico.

Relatos de microrganismos causadores de doenças em plantas que utilizam recursos alternativos, como insetos, são raros, entretanto, foi relatado um caso notável de *Colletotrichum gloeosporioides* como responsável por epizootias na cochonilha *Praelongorthezia praelonga* (Douglas) (sin. *Orthezia praelonga* Douglas) (Hemiptera: Ortheziidae), uma das principais pragas de citros no Brasil. O controle biológico da *P. praelonga*, utilizando *C. gloeosporioides*, foi realizado no Brasil por Cesnik e Ferraz (2000) em pomares comerciais, alcançando mortalidades de cochonilhas entre 85% e 96%, 70 dias após a aplicação do fungo (Cesnik; Ferraz, 2000).

Em 2002, uma epizootia fúngica foi relatada na população de *Fiorinia externa* Ferris, 1942 (Hemiptera: Diaspididae) em Nova York, EUA, uma praga que afeta a cicuta oriental (*Tsuga canadensis* [L.] Carrière). Escleródios foram observados recobrindo os corpos mumificados de cochonilhas adultas, e análises morfológicas e moleculares identificaram um complexo de fungos entomopatogênicos, fitopatogênicos e saprofíticos associados aos insetos doentes. Entre essas espécies, *Colletotrichum acutatum* var. *fioriniae* foi a mais dominante no complexo, sendo consistentemente recuperada de populações de *F. externa* na maioria das áreas afetadas pela epizootia (Marcelino et al., 2008, 2009). No mesmo estudo, esse fungo também foi identificado como endofítico na maioria das plantas analisadas nas áreas amostradas (Marcelino et al., 2008). Além disso, os dados sugerem que *C. acutatum* var. *fioriniae*, associado a epizootias de *F. externa* nos EUA, e *C. gloeosporioides* f. sp. *ortheziidae*, previamente relatado causando epizootias em *P. praelonga* no Brasil, podem representar espécies distintas de *Colletotrichum* que desenvolveram a capacidade de infectar insetos, além dos hospedeiros vegetais tradicionalmente relatados (Marcelino et al., 2009).

De acordo com WYNNS et al. (2020), o fungo anteriormente classificado como *C. gloeosporioides* f. sp. *ortheziidae* foi reclassificado como *C. nympheae* com base em estudos morfológicos e análises filogenéticas e atualmente, está em desenvolvimento para aplicação comercial como agente de controle biológico em citros no Brasil.

Esses estudos fornecem evidências importantes que sustentam a hipótese de que um patógeno vegetal pode atuar de forma oportunista como entomopatógeno, causando alta mortalidade em insetos herbívoros. Em vários sistemas de vespas galhadoras cinipídeos, por exemplo, fungos utilizam o tecido das galhas como um recurso nutritivo e podem ser responsáveis pela mortalidade

dos galhadores. No caso das galhas causadas pela vespa asiática *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae), uma praga global que afeta hospedeiros do gênero *Castanea*, o fungo *Colletotrichum* penetra nas galhas inicialmente formando necroses superficiais. Em menos de 14 dias, essas necroses se espalham por toda a galha, e à medida que o fungo invade os tecidos do inseto, causa sua mortalidade. Essa infecção beneficia o fungo, permitindo que ele atue como um entomopatógeno oportunista ao explorar o inseto herbívor invasor como recurso alternativo. Notavelmente, o parasitoide *Torymus sinensis*, inimigo natural da vespa, não é afetado, sugerindo que essa interação pode estar restringindo a invasividade de *D. kuriphilus* nos Estados Unidos (Graziosi; Rieske, 2015).

Nesse contexto, os resultados da pesquisa com *Colletotrichum* isolado de *C. stenophylla* reforçam a versatilidade ecológica desse fungo e sua capacidade de atuar como um potencial entomopatógeno. A alta mortalidade observada em larvas de *T. molitor* (70%) sugere que esse fungo pode desempenhar um papel importante no controle biológico de insetos. A análise dos mecanismos envolvidos na mortalidade dos insetos revelou que seu efeito entomopatogênico não se deve exclusivamente à ação dos conídios ou do micélio, mas sim a uma interação sinérgica entre conídios, hifas e metabólitos, destacando um mecanismo multifatorial de infecção e letalidade.

Essa descoberta apresenta um paralelo interessante com a interação entre *Colletotrichum* e *D. kuriphilus*, onde o fungo, inicialmente associado às plantas, coloniza as galhas da vespa e acaba atuando como um entomopatógeno oportunista. Em ambos os casos, *Colletotrichum* explora um novo nicho, passando de um estado endofítico ou patogênico na planta para um papel ativo na regulação de populações de insetos.

A transição entre esses estilos de vida pode estar associada à expressão diferencial de genes relacionados à patogenicidade, à presença de estressores externos como ferimentos no hospedeiro ou mudanças nas condições ambientais (umidade, temperatura, nutrientes) e à produção de compostos bioativos que modulam a interação com o hospedeiro. Em condições equilibradas, a relação endofítica é mantida de forma assintomática, mas alterações ambientais ou do hospedeiro podem induzir a expressão de genes de virulência, levando ao comportamento patogênico ou mesmo à infecção de insetos, demonstrando a versatilidade e o potencial adaptativo desse fungo (Freeman; Horowitz; Sharon, 2001).

Além disso, o estilo de vida dos fungos associados a plantas pode ser considerado em termos do hospedeiro colonizado, sendo que relatos recentes sugerem que muitos fungos tradicionalmente classificados como patógenos podem se comportar como endofíticos em hospedeiros alternativos e vice-versa (Newfeld; Ujimatsu; Hiruma, 2025). Por exemplo, *Colletotrichum tofieldiae*, originalmente isolado de *Ornithogalum umbellatum* (Asparagales:

Asparagáceas) doente, atua de forma endofítica em *Arabidopsis thaliana*, o que é atribuído, ao menos em parte, à ausência de expressão de um cluster gênico relacionado à biossíntese do ácido abscísico e metabólitos secundários (ABA-BOT), presente em cepas patogênicas intimamente relacionadas (Hiruma et al., 2023). Como outro exemplo, cepas endofíticas foliares de *Colletotrichum*, isoladas de uma planta invasora, demonstraram virulência em espécies vegetais nativas da China (Yang et al., 2024).

No entanto, a falta de compreensão sobre os mecanismos responsáveis pela mortalidade das larvas de tenébrio em laboratório evidencia a necessidade de estudos adicionais para determinar se essa ação ocorre por infecção direta, produção de toxinas, degradação dos tecidos do inseto ou uma combinação desses fatores.

Uma das características relevantes dos fungos endofíticos é sua capacidade de produzir diversas enzimas, que podem estar envolvidas na colonização do hospedeiro e na interação com outros organismos (Ali; Huang; Ren, 2009).

O tegumento dos insetos, composto principalmente por proteínas e quitina, além de lipídios associados e compostos fenólicos, atua como uma barreira natural contra microrganismos invasores. No entanto, alguns fungos são capazes de superar essa barreira por meio da secreção de enzimas hidrolíticas, como quitinases, proteases e lipases, permitindo a penetração do micélio e a infecção do hospedeiro (Ali; Huang; Ren, 2009). A importância dessas enzimas varia conforme a composição cuticular do inseto e o mecanismo de invasão do fungo. No caso de *B. bassiana*, a participação dessas enzimas no processo de infecção já foi demonstrada por (Zibaee; Sadeghi-Sefidmazgi; Fazeli-Dinan, 2011), destacando seu papel na patogenicidade contra insetos.

Diante disso, realizamos um estudo comparativo entre *Colletotrichum* e *B. bassiana* cepa IBCB 66, a fim de avaliar a capacidade desses fungos de produzir protease, lipase e quitinase. Os ensaios foram conduzidos em placas de Petri, permitindo a análise qualitativa da produção dessas enzimas e sua possível relação com a mortalidade de insetos. Os resultados mostraram que *B. bassiana* IBCB 66 produziu proteases, reforçando seu mecanismo conhecido de infecção por degradação proteica da cutícula do inseto. No entanto, *Colletotrichum* não demonstrou atividade proteolítica, sugerindo que sua patogenicidade pode envolver outros mecanismos ainda não elucidados. Resultados semelhantes foram observados em um estudo realizado por (Thirunavukkarasu et al., 2017), no qual *Colletotrichum* sp. isolado de folhas de jamelão (*Syzygium cumini*), jasmim-laranja (*Murraya paniculata* L.) e *Kydia calycina* também não apresentou produção de protease em ensaio dot blot, que identifica qualitativamente a presença de enzimas específicas — como proteases — por meio da ligação de anticorpos a proteínas imobilizadas em membranas, permitindo a detecção de sua expressão ou secreção. Esses achados indicam que a ausência de atividade proteolítica pode ser uma característica comum a algumas linhagens de *Colletotrichum*, reforçando a

necessidade de investigar outras estratégias que esse fungo possa utilizar em seu processo de infecção.

Uma dessas possibilidades envolve a ação de enzimas lipolíticas, que desempenham um papel essencial na degradação da epicutícula dos insetos. Como essa camada é composta por uma mistura de lipídios, alcanos de cadeias longas, ésteres e ácidos graxos, as lipases atuam promovendo a hidrólise das ligações ésteres das lipoproteínas, gorduras e ceras. Essas enzimas facilitam a adesão dos propágulos fúngicos à cutícula, uma vez que a liberação de ácidos graxos aumenta a hidrofobicidade da superfície e favorece a fixação do fungo ao hospedeiro (Ali; Ren; Huang, 2010). No entanto, o complexo enzimático lipolítico é amplo e envolve diferentes reações, tornando difícil seu mapeamento preciso e a interpretação do sistema enzima-artrópode.

A avaliação da atividade lipolítica em fungos pode ser feita por meio de métodos como em placa de ágar sólido, amplamente descrito como uma das abordagens mais diretas e eficientes para examinar o crescimento fúngico e sua capacidade de produção de enzimas extracelulares (Hankin; Anagnostakis, 1975). Esse método tem sido amplamente utilizado para triagem de fungos, especialmente no que diz respeito à produção de lipases, com substratos indutores como azeite de oliva, tributirina, Tween-20 e Tween-80, sendo preferidos por pesquisadores (Geoffry; Achur, 2018).

No presente estudo, foi utilizado um meio de cultura contendo sais e Tween-20 como substrato, permitindo a observação de atividade lipolítica em *B. bassiana*, mas não em *Colletotrichum*. Entretanto, estudos anteriores demonstram que a ausência de atividade lipolítica pode estar relacionada à escolha do substrato. Colen; Junqueira; Moraes-Santos, (2006), por exemplo, ao isolarem 59 linhagens fúngicas produtoras de lipase do solo do Cerrado brasileiro, utilizaram um meio contendo sais biliares e emulsão de azeite de oliva para triagem primária. Dentre as 21 linhagens selecionadas, 11 foram consideradas altamente produtivas, sendo que *Colletotrichum gloeosporioides* destacou-se como a mais eficiente na produção de lipase.

A quitina, um homopolímero linear de N-acetilglucosamina, é um componente estrutural importante da cutícula dos insetos. Além de sua presença na cutícula dos artrópodes, a quitina também integra a membrana ou matriz peritrófica do intestino médio dos hospedeiros, sendo formada essencialmente por fibras de quitina e proteínas. Essa matriz desempenha um papel crucial na sobrevivência dos organismos, protegendo-os contra infecções orais causadas por diversos patógenos. A degradação da quitina na cutícula por fungos ocorre por meio de um complexo enzimático que atua de forma sinérgica e consecutiva, hidrolisando a quitina em monômeros de N-acetilglucosamina (Valadares-Inglis; Lopes; Faria, 2020).

Fungos entomopatogênicos produzem enzimas que digerem quitina, como quitinases, endoquitinases, exoquitinases e quitobiases. Como a quitina também compõe a parede celular de

fungos, o complexo de quitinases exerce funções tanto na degradação da parede celular de outros fungos quanto na degradação da cutícula de insetos hospedeiros. No entanto, ainda existem lacunas no entendimento sobre os papéis específicos dessas enzimas, a possível sobreposição de suas funções, os mecanismos de regulação e os sinais que induzem sua expressão (Seidl, 2008).

Nesse contexto, o presente estudo é relevante, pois demonstra que o fungo endofítico *Colletotrichum* é uma fonte promissora de enzimas quitinolíticas, as quais podem estar associadas ao ataque contra insetos. Estudos realizados por Rajulu et al. (2001) corroboram esses achados, evidenciando que uma alta diversidade genética de fungos endofíticos é capaz de produzir enzimas quitinolíticas. Fungos como *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp. e *Xylariaceae* spp. apresentaram resultados positivos para todas as enzimas testadas, incluindo quitinases e quitosanases que atuam na quitosana com diferentes graus de acetilação. Entretanto, a capacidade de produção de enzimas por uma mesma espécie de endófito pode variar dependendo do hospedeiro de onde foi isolada. Por exemplo, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium* sp., *Phomopsis* sp. e *Phyllosticta capitalensis* demonstraram diferenças na produção de enzimas modificadoras de quitina quando isolados de diferentes espécies de hospedeiros vegetais.

Explorar uma ampla diversidade de grupos ecológicos de fungos para identificar enzimas modificadoras de quitina pode contribuir para responder questões relacionadas ao redesenho da parede celular e aos mecanismos de defesa ou ataque contra fungos e insetos. Além disso, a possibilidade de que as enzimas quitinolíticas produzidas por endofíticos desempenhem um papel na regulação da defesa das plantas contra patógenos e pragas *in vivo* merece ser investigada mais profundamente.

Esses achados reforçam a necessidade de aprofundar os estudos sobre os mecanismos de infecção de *Colletotrichum*, investigando outros fatores que possam estar associados à sua ação entomopatogênica. Compreender essas interações é fundamental para avaliar seu potencial como agente de controle biológico e seu papel na regulação natural das populações de insetos fitófagos.

*Colletotrichum* é um gênero de fungos fitopatogênicos que emprega diferentes estratégias de infecção em plantas, podendo atuar de forma endofítica, hemibiotrófica ou por crescimento intramural subcuticular (Smith; Korsten; Aveling, 1999). Como endofítico, pode permanecer dentro dos tecidos vegetais sem causar sintomas visíveis, enquanto na estratégia hemibiotrófica, inicialmente cresce de forma biotrófica, retirando nutrientes das células vivas, antes de entrar em uma fase necrotrófica, causando a morte celular e destruição dos tecidos. Já o crescimento intramural subcuticular ocorre quando o fungo se desenvolve dentro das paredes celulares ou na região subcuticular sem penetrar diretamente no citoplasma celular. Em muitos hospedeiros, observa-se um crescimento intercelular quiescente no mesofilo em vez de um comportamento necrotrófico ativo, o que sugere uma estratégia para evitar o reconhecimento pelo sistema de

defesa da planta e ativar a infecção apenas sob condições favoráveis, como o estresse do hospedeiro (Wei et al., 2004).

No caso de *Coffea*, o fato de *Colletotrichum* já estar presente na planta pode representar uma vantagem ecológica no controle de insetos fitófagos. Um exemplo notável é o efeito da inoculação de *Theobroma cacao* com *Colletotrichum tropicale*. Estudos realizados por (MejÃ-a et al., 2014), mostraram que a interação entre o cacau e o endofítico induz a superexpressão de grandes conjuntos de genes do hospedeiro relacionados à defesa contra patógenos e ataques de herbívoros. Especificamente, a superexpressão do gene *Tc00g042540*, altamente regulado em plantas tratadas com endofíticos (E+), reduziu significativamente os danos causados por patógenos. Esses efeitos não são atribuídos à ação direta do fungo, como a produção de compostos químicos ou sua presença física na planta, mas sim à capacidade do endofítico de induzir uma resposta de defesa no hospedeiro.

Os genes influenciados pela presença de *C. tropicale* estão envolvidos em várias vias importantes, como sinalização de etileno, defesa mediada por ácido jasmônico e proteínas relacionadas à patogênese (como PR4). Outros genes modulados incluem aqueles associados à síntese, modificação e degradação da parede celular, peroxidases, proteínas de choque térmico, beta-glucanases (defesa contra fungos patogênicos), fatores de transcrição e metabolismo secundário. Além disso, genes relacionados à interação planta-micrório, como *NPR3*, nodulina e endoquitinases, também apresentam alterações na expressão (MejÃ-a et al., 2014).

Esses achados sugerem que os endofíticos, como *C. tropicale*, desempenham um papel crucial no fortalecimento das defesas naturais das plantas, promovendo a ativação de mecanismos de resistência. Contudo, estudos adicionais são necessários para determinar a contribuição relativa dos efeitos diretos e indiretos de diferentes espécies endofíticas na resistência do hospedeiro a patógenos, tanto local quanto sistemicamente. Explorar essas interações planta-endofítico pode abrir novas possibilidades para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis de manejo agrícola, potencializando o controle de pragas e doenças sem comprometer o equilíbrio ecológico das culturas.

## 2.5 Conclusão

Neste estudo, foram isolados mais de 60 microrganismos endofíticos das folhas de *C. racemosa* e *C. stenophylla*. Entre os isolados, o gênero *Colletotrichum* destacou-se pela sua notável capacidade de causar mortalidade em larvas de *T. molitor*, além de produzir quitinase, uma enzima essencial para a degradação da quitina presente na cutícula de insetos. Os resultados indicaram que conídios, hifas e metabólitos do fungo atuaram de forma sinérgica, contribuindo significativamente para os efeitos observados na mortalidade das larvas.

Para aprofundar o entendimento sobre o papel desse fungo na resistência de plantas a insetos, é necessário realizar a identificação molecular detalhada com base em diferentes regiões gênicas, a fim de determinar a espécie de *Colletotrichum* envolvida. Além disso, estudos adicionais que explorem a expressão genética e fenotípica em plantas de *C. stenophylla* poderiam fornecer informações valiosas sobre os mecanismos pelos quais esse fungo endofítico influencia a defesa natural das plantas.

Essas investigações complementares são fundamentais para ampliar o conhecimento sobre as interações planta-fungo e para explorar o potencial de *Colletotrichum* como uma ferramenta biológica no manejo sustentável de pragas agrícolas.

## CAPÍTULO 3: ESTUDO METABOLÔMICO DE ESPÉCIES DE *COFFEA*

### 3.1 Introdução

O cafeiro é uma planta perene pertencente à família Rubiaceae, gênero *Coffea* L. que contém três espécies utilizadas na produção do café: *C. arabica* (café arábica), *C. canephora* (café robusta ou conilon) e *C. liberica* (café liberiano, também conhecido como Liberica ou café excelsa). Dentre essas, *C. arabica* é a espécie comercial mais importante (Davis et al., 2006).

O Brasil tem se consagrado como o maior produtor e exportador de café do mundo, mantendo uma posição de destaque no mercado global por décadas. Em 2024, o Brasil exportou 50,5 milhões de sacas de 60 quilos de café, estabelecendo um novo recorde. Esse desempenho representou um crescimento de 28,8% em relação ao ano anterior. Como resultado, o país gerou uma receita de US\$ 12,3 bilhões, o maior valor já registrado, com um aumento de 52,6% em comparação a 2023 (CONAB, 2024).

Embora a cafeicultura do Brasil tenha experimentado grandes ganhos econômicos, os desafios para a manutenção dessa cadeia produtiva são vários, entre os quais estão as pragas que ameaçam a cultura, incluindo o bicho-mineiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet) (Lepidoptera: Lyonetiidae).

O bicho-mineiro é um inseto que passa por uma metamorfose completa, com seu ciclo de vida composto pelas fases de ovo, lagarta, pupa e adulto. Causa prejuízos ao cafeiro exclusivamente durante a fase larval de seu ciclo de vida. As lesões provocadas por esse inseto são conhecidas como minas, formadas quando a lagarta atravessa a cutícula da folha e escava cavidades ao consumir o parênquima paliçádico. Essas marcas apresentam coloração amarelo-clara e contornos irregulares (Guerreiro Filho; Medina Filho; Carvalho, 1991; Reis; Souza, 2002).

Infestações por *L. coffeella* podem comprometer severamente a produtividade do cafeiro, com reduções de até 50% na produção, atribuídas à diminuição da área fotossintética em decorrência da ação das lagartas e à queda precoce das folhas. A integridade da função fotossintética é prejudicada devido à interrupção do fluxo de água, sais minerais e compostos orgânicos, ocasionada pelas lesões foliares (Darbello, 2011; Konnorova; De La Veja, 1985). Além disso, a principal causa das perdas produtivas está associada ao desfolhamento induzido pelo aumento dos níveis de etileno nas plantas atacadas (Souza; Reis; Rigitano, 1998).

A severidade dos danos provocados por *L. coffeella* está diretamente relacionada à exigência alimentar da lagarta e à extensão das lesões promovidas durante sua alimentação. A voracidade larval é influenciada por fatores abióticos, sendo intensificada em condições de temperaturas elevadas e baixa umidade relativa (Konnorova; De La Veja, 1985). Segundo dados de (Nantes;

Parra, 1977), cada lagarta pode destruir, em média, 1,15 cm<sup>2</sup>, 1,36 cm<sup>2</sup> e 1,03 cm<sup>2</sup> da área foliar das cultivares Catuaí, Mundo Novo e Icatu, respectivamente.

Infestações severas de *L. coffeella* podem resultar em perdas expressivas para a planta, incluindo a redução de até 61% da área foliar, 70% da massa do tronco, 60% da biomassa radicular e 50% da atividade fisiológica das folhas (Konnorova; De La Veja, 1985). Além disso, a longevidade das plantas afetadas é significativamente reduzida, uma vez que há um aumento considerável na demanda energética para a regeneração da parte aérea danificada (Souza; Reis; Rigitano, 1998).

Atualmente, a proteção das lavouras de café contra *L. coffeella* ainda depende majoritariamente do uso de inseticidas químicos. Diversos ingredientes ativos estão disponíveis no mercado, sendo os mais empregados o tiameksam (Souza; Reis; Rigitano, 1998), o clorantraniliprole (Fragoso et al., 2002) e o cloridrato de cartape (Melo et al., 2019). Pesquisas que avaliaram a persistência dessas moléculas demonstraram que o tiameksam pode ser detectado nas plantas por até oito meses após a aplicação via solo, apresentando eficácia no controle da praga e relativa seletividade aos inimigos naturais. Estudos conduzidos por Diez-Rodríguez et al., (2006) e Souza et al. (2006) relataram que a proteção conferida pelo tiameksam se estendeu por mais de 180 dias, enquanto plantas não tratadas exibiram redução produtiva superior a 50%.

Dessa forma, o uso de inseticidas tem sido essencial, principalmente em regiões com alta pressão da praga, como o Cerrado brasileiro, onde predominam temperaturas elevadas e longos períodos de estiagem. Entretanto, o uso contínuo e intensivo de produtos químicos no controle de pragas pode acelerar a seleção de populações resistentes, sobretudo quando há repetição do mesmo ingrediente ativo ou de outros com o mesmo mecanismo de ação. Além disso, os riscos associados aos agrotóxicos — tanto à saúde dos trabalhadores quanto ao meio ambiente — não podem ser ignorados (Almeida et al., 2020). Leite et al., (2020) relataram que 94% das populações de *L. coffeella* avaliadas no estado da Bahia apresentaram resistência ao clorantraniliprole, indicando um alto potencial de falhas no controle químico convencional.

Nesse contexto, os programas de melhoramento genético do cafeiro voltados à resistência ao bicho-mineiro surgem como uma estratégia promissora. Entretanto, esses programas enfrentam desafios consideráveis, principalmente devido à limitada variabilidade genética de *C. arabica*, o que exige a utilização de hibridações interespecíficas como forma de introduzir genes de resistência (Carvalho, 2008).

Uma das espécies mais utilizadas como fonte de resistência é *Coffea racemosa*, uma planta diplóide alógama ( $2n = 2x = 22$ ), dotada de um sistema de autoincompatibilidade gametofítico, o que confere ampla variabilidade genética entre seus indivíduos. Originária de regiões semiáridas de Moçambique, *C. racemosa* apresenta, além da resistência ao bicho-mineiro, tolerância à seca

(Medina Filho; Carvalho; DM., 1977). Em contraste, *C. arabica* é uma espécie allotetraplóide ( $2n = 4x = 44$ ), autocompatível, com reprodução predominantemente por autofecundação, o que contribui para sua baixa diversidade genética em comparação com outras espécies do gênero *Coffea* (Carvalho, 2008; Salojärvi et al., 2024).

Com base em estudos de suscetibilidade, *C. stenophylla*, *C. brevipes*, *C. liberica* e *C. salvatrix* foram classificadas como altamente resistentes à praga, enquanto *C. racemosa*, *C. kapakata*, *C. dewevrei* e *C. eugeniooides* apresentam resistência moderada. Já *C. congener*, *C. canephora* e *C. arabica* são consideradas suscetíveis (Guerreiro Filho; Medina Filho; Carvalho, 1991).

Atualmente, estão disponíveis comercialmente no Brasil duas cultivares com resistência ao bicho-mineiro e propagação por sementes: Siriema AS1 e Siriema AS2 (Registro Nacional de Cultivares - RNC - [sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb](http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb)). Como alternativa, o desenvolvimento de cultivares clonais tem ganhado destaque, uma vez que permite o uso de híbridos ou plantas em segregação. Um exemplo é a Siriema VC4, cultivar clonal composta por um grupo de quatro clones com resistência à praga (Matiello et al., 2015).

No entanto, a herança genética associada à resistência ao bicho-mineiro ainda não foi completamente elucidada, o que representa um desafio para a fixação estável dessa característica em genótipos produtivos e com qualidade de bebida superior. Nesse sentido, a obtenção de informações complementares que ajudem a compreender os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na resistência torna-se essencial.

Uma estratégia promissora nesse contexto é a identificação de metabólitos que possam estar associados à resposta defensiva do cafeiro à infestação de *L. coffeella*. Técnicas como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) permitem detectar e quantificar compostos de interesse com alta sensibilidade e especificidade. A partir desses dados, a abordagem metabólica se mostra especialmente eficiente, pois possibilita uma análise ampla e integrada dos perfis metabólicos, contribuindo para a elucidação dos processos biológicos envolvidos na resistência (Oh et al., 2023).

Os metabólitos são compostos originados e modificados pelas atividades metabólicas de sistemas biológicos, como células, tecidos ou organismos inteiros. Esses compostos englobam uma ampla variedade de moléculas, incluindo peptídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos, lipídios, carboidratos, ácidos orgânicos, vitaminas, polifenóis, alcaloides, minerais, entre outros, os quais podem ser tanto sintetizados quanto absorvidos pelos organismos. Os níveis desses metabólitos podem sofrer alterações significativas em resposta a estímulos ambientais, sejam eles de origem biótica ou abiótica. A análise dessas modificações permite caracterizar organismos e prever suas respostas metabólicas específicas, fornecendo insights sobre os mecanismos regulatórios das vias metabólicas envolvidas (Poltronieri; Burbulis; Fogher, 2013). No caso das plantas, a diversidade

metabólica é particularmente notável: estima-se que mais de 200 mil metabólitos distintos já tenham sido identificados (Weng et al., 2021). Esses compostos atuam como substratos em reações enzimáticas, e suas variações qualitativas e quantitativas desempenham papel determinante na expressão do fenótipo dos organismos (Oh et al., 2023).

Dentro desse contexto, a metabolômica surge como uma abordagem poderosa para investigar o conjunto total de metabólitos de baixo peso molecular — geralmente inferior a 1500 Da — presentes em um sistema biológico em um momento específico. Essa ciência permite a análise tanto qualitativa quanto quantitativa desses compostos, oferecendo uma visão abrangente do estado metabólico do organismo e possibilitando a identificação de alterações associadas a diferentes condições fisiológicas, ambientais ou genéticas (Oh et al., 2023).

Com isso, este trabalho teve como objetivo caracterizar os perfis metabolômicos das folhas de *Coffea racemosa*, *Coffea stenophylla*, *Coffea arabica* cv. Siriema IAC 1059 e *C. arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC 62, os quais apresentam diferentes níveis de suscetibilidade ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*), por meio de análises com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). O intuito foi gerar informações bioquímicas que possam subsidiar programas de melhoramento genético, integrando abordagens metabolômicas e moleculares voltadas à seleção de genótipos com maior resistência à praga.

### 3.2 Material e Métodos

No banco de germoplasma de café do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), foram coletadas folhas sem sinais de infestação de bicho-mineiro dos genótipos: *C. racemosa* (resistente), *C. stenophylla*, *C. arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC 62 (suscetível) e o híbrido experimental resistente IAC 1059 (oriundo do cruzamento entre *C. arabica* e *C. racemosa*). Embora ainda não registrado comercialmente, o IAC 1059 foi incluído no estudo por sua relevância genética e por compartilhar a mesma origem híbrida da cultivar Siriema. Ambos os materiais aparentados foram selecionados a partir de gerações avançadas desse cruzamento inicial, o que se reflete em perfis metabolômicos semelhantes e na presença de metabólitos associados à resistência ao bicho-mineiro.

As folhas foram coletadas de forma aleatória do terço médio de cada indivíduo, selecionando-se apenas as folhas maduras pertencentes ao 3º ou 4º par de folhas de cada ramo plagiotrópico. A coleta das folhas ocorreu em outubro de 2024. Após a coleta, as folhas foram transportadas para o laboratório, onde passaram por uma limpeza delicada com papel toalha. Em seguida, foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas e enviadas à Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Paranaíba, Minas Gerais, para a realização da análise metabolômica não direcionada, utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). A análise foi conduzida pelo

Grupo de Pesquisa e Análise Metabolômica da instituição, segundo protocolos padronizados para a identificação e quantificação de metabólitos em tecidos vegetais.

Para a análise metabolômica, foi adotada a metodologia descrita por Ikehara et al. (dados não publicados). As folhas de café dos quatro genótipos foram maceradas em nitrogênio líquido, e a extração foi realizada utilizando 100 mg de amostra e 2 mL de uma solução extratora composta por metanol, clorofórmio e água (MeOH:CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O – 3:1:1), contendo 50 µL/mL de Adonitol Purex como padrão interno. Em seguida, a mistura foi submetida à agitação em um disruptor celular (L-Beader 6, Loccus, Brasil), operando a 3500 rpm em quatro ciclos de 60 segundos, com seis esferas de aço inoxidável de 2,8 mm de diâmetro por tubo."

Após esse processo, 1 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 300 µL de hexano, permanecendo em repouso por 3 minutos. Em seguida, 500 µL da fase inferior foram coletados e transferidos para microtubos, onde foram submetidos à secagem em concentrador de amostras a 40°C por 16 horas. As amostras secas foram derivatizadas com 50 µL de cloridrato de metoxiamina diluído em piridina (20 mg/mL) e, posteriormente, com 50 µL de BSFTA ([bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida]). Após a adição de cada derivatizante, as amostras foram incubadas por 30 minutos em concentrador de amostras e, em seguida, resfriadas. As alíquotas derivatizadas foram então transferidas para frascos cromatográficos contendo insertos redutores de 200 µL. Todos os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos da Sigma-Aldrich, incluindo adonitol Purex, cloridrato de metoxiamina, bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida, metanol grau HPLC, clorofórmio, água, hexano e piridina.

A análise foi realizada usando cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (GCMS-QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com uma coluna capilar DB-5MS (diâmetro interno de 30m×250 µm). A temperatura de injeção da amostra usada foi de 280 °C, com um fluxo constante de gás hélio de 1,0 mL/min durante todo o processo. A temperatura inicial para separação cromatográfica foi de 80°C, que foi mantida por 2 minutos. Posteriormente, a temperatura foi aumentada em 5°C a cada minuto, até 290°C, que foi mantida por 5 minutos. O volume de injeção foi de 1 µL com uma divisão de 20:1. As temperaturas da interface e da fonte de íons usadas foram de 250 °C. A voltagem do detector foi de 1,2 kV, e o modo de ionização por impacto de elétrons foi selecionado para a ionização de metabólitos como 70 eV. Um padrão de alcano (C10-C40) foi usado como controle de qualidade e cálculo do índice de retenção. Os cromatogramas foram processados usando MS-DIAL (v. 4.9.2). Os metabólitos foram identificados com base na biblioteca NIST 2014 e Kovats RI de acordo com o tempo de retenção e razão massa/carga das moléculas e fragmentos.

As análises estatísticas e a construção de vias bioquímicas foram realizadas usando o software MetaboAnalyst 6.0 e o enriquecimento de vias foi realizado usando a Kyoto Encyclopedia of

Genes and Genomes (KEGG). Teste T, análise de variância (ANOVA) e análise de enriquecimento de vias foram conduzidos considerando  $p < 0,05$  como significativo. Valores não presentes em 50% dos dados foram removidos da análise. Os valores ausentes foram substituídos por um valor pequeno (considerou-se metade do valor positivo mínimo nos dados originais), e os dados foram filtrados por desvio padrão relativo, soma normalizada, transformada em log 2 e autodimensionada. A análise de mapa de calor baseada em agrupamento hierárquico foi usada para visualização de dados metabolômicos, onde a abundância relativa de íons detectados em cada amostra é representada pela intensidade da cor.

### 3.3 Resultados

Em relação ao perfil químico das folhas de cafeiro e relação à resistência ao bicho-mineiro, obtidos por meio das análises de metabolômica global nos quatro genótipos de cafeiro, *C. stenophylla* (resistente ao bicho-mineiro), *C. racemosa* (resistente), híbrido resistente IAC 1059 e *C. arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC 62 (suscetível) detectou-se um total de 220 compostos nas amostras foliares, utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Desses, 58 compostos (26,48%) foram identificados e categorizados com sucesso.

O Fold Change (FC) representa a razão entre os valores de intensidade dos tratamentos comparados, sendo amplamente utilizado para destacar variações na abundância relativa de metabólitos entre diferentes condições biológicas. Com base nessa métrica, foram identificados 21 metabólitos diferencialmente acumulados entre os genótipos *Coffea stenophylla* e *C. arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC 62, dos quais 9 apresentaram intensidades aumentadas e 12 tiveram intensidades reduzidas em *C. stenophylla*, em comparação com *C. arabica*. Dentre os metabólitos aumentados, estão os carboidratos xilulose (FC = 20,093, p-valor = 0,005662), maltotriose (FC = 4,5097, p-valor = 0,027558) e tagatofuranose (FC = 2,4379, p-valor = 0,040395), o glicosídeo derivado da manose, manopiranósídeo (FC = 2,1764, p-valor = 0,041068), os ácidos: málico (FC = 69,135, p-valor = 0,00096), ácido butanodióico (também conhecido como ácido succínico) (FC = 45,876, p-valor = 0,004072), ácido isotreônico (FC = 33,411, p-valor = 0,001704), ácido quínico (FC = 10,562, p-valor = 0,016016), e o éster valerato de citronelila (FC = 1,3734, p-valor = 0,01527). Os metabólitos reduzidos foram os carboidratos ribose (FC = 0,77454, p-valor = 0,014682), lixose (FC = 0,70964, p-valor = 0,01557), manose (FC = 0,61047, p-valor = 0,008335), Mio-inositol (FC = 0,73724, p-valor = 0,045494), 1-Questose (FC = 0,27996, p-valor = 0,039506), diglicerol (FC = 0,34982, p-valor = 0,028075), arabinol (FC = 0,26788, p-valor = 0,039784), os ácidos propanodióico (outro nome para ácido malônico) (FC = 0,51126, p-valor = 0,041884), ácido ribônico (FC = 0,38584, p-valor = 0,004558), ácido metoxiacético (FC = 0,31174, p-valor =

0,006349), e outros compostos orgânicos como triacontano (FC = 0,069821, p-valor = 0,000466) e fenetilamina (FC = 0,048505, p-valor = 0,006281).

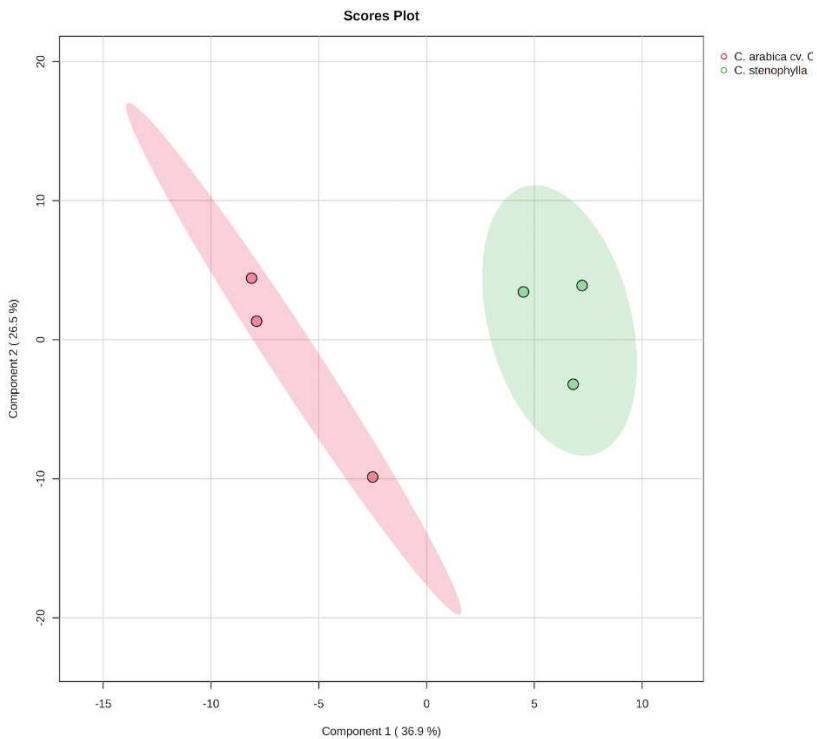
Esses metabólitos identificados foram categorizados em classes distintas, incluindo compostos açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, ésteres, polialcoois, hidrocarbonetos e compostos nitrogenados, juntamente com seus valores de FC correspondentes (Tabela 1).

**Tabela 1.** Metabólitos selecionados que diferiram significativamente entre folhas de *C. stenophylla* e *C. arabica* IAC 62 (valor de  $p < 0,05$ ). Fold change (FC) representa a razão entre os valores de intensidade dos tratamentos, destacando alterações em abundância relativa.

<b>MONOSSACARÍDEOS</b>		
COMPOSTO	FC <i>C. stenophylla/C. arabica</i>	p-valor
<b>XILULOSE</b>	20,093	0,005662
<b>RIBOSE</b>	0,77454	0,014682
<b>LIXOSE</b>	0,70964	0,01557
<b>MANOSE</b>	0,61047	0,008335
<b>DISSACARÍDEOS E OLIGOSSACARÍDEOS</b>		
	FC	p-valor
<b>MALTOTRIOSE</b>	4,5097	0,027558
<b>1-QUESTOSE</b>	0,27996	0,039506
<b>POLIALCOOIS (AÇÚCARES-ALCOÓIS)</b>		
	FC	p-valor
<b>MIO-INOSITOL</b>	0,73724	0,045494
<b>ARABITOL</b>	0,26788	0,039784
<b>DIGLICEROL</b>	0,34982	0,028075
<b>ÁCIDOS CARBOXÍLICOS</b>		
	FC	p-valor
<b>ÁCIDO MÁLICO</b>	69,135	0,00096
<b>ÁCIDO BUTANODIÓICO</b>	45,876	0,004072
<b>ÁCIDO ISOTREÔNICO</b>	33,411	0,001704
<b>ÁCIDO QUÍNICO</b>	10,562	0,016016

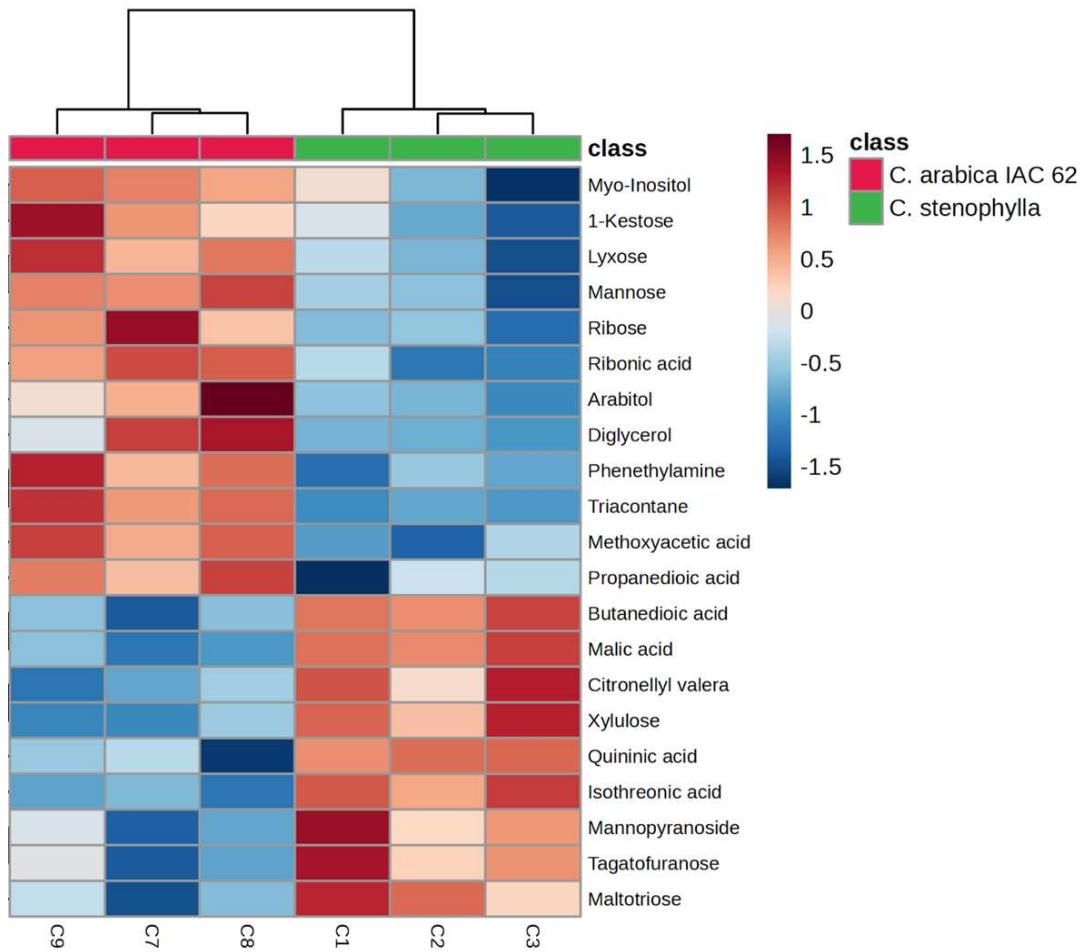
<b>ÁCIDO PROPANEDIOICO</b>	0,51126	0,041884
<b>ÁCIDO METOXIACÉTICO</b>	0,31174	0,006349
<b>ÁCIDOS DERIVADOS DE CARBOIDRATOS</b>		
	<b>FC</b>	<b>p-valor</b>
<b>ÁCIDO RIBÔNICO</b>	0,38584	0,004558
<b>ÉSTERES E DERIVADOS DE ÁCIDOS GRAXOS</b>		
	<b>FC</b>	<b>p-valor</b>
<b>VALERATO DE CITRONELILA</b>	1,3734	0,01527
<b>HIDROCARBONETOS</b>		
	<b>FC</b>	<b>p-valor</b>
<b>TRIACONTANO</b>	0,069821	0,000466
<b>AMINAS E COMPOSTOS NITROGENADOS</b>		
	<b>FC</b>	<b>p-valor</b>
<b>FENETILAMINA</b>	0,048505	0,006281
<b>MANOPIRANOSÍDEO</b>	2,1764	0,041068

A análise de componentes principais (PCA) demonstrou claramente uma separação dos metabolomas de folhas de *C. stenophylla* e *C. arabica* (Figura 1). O primeiro componente principal (PC1) foi responsável por 36,9% da variância, enquanto o segundo componente principal (PC2) contribuiu com 26,5%, resultando em uma variância explicada cumulativa de 63,4%.



**Figura 1.** Pontuação PCA ilustrando a diferenciação de amostras de folha de *C. stenophylla* e *C. arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC 62.

Na Figura 2 observa-se 21 metabólitos significativamente diferentes, com 9 mostrando níveis de expressão mais elevados nas folhas de *C. stenophylla* e 12 exibindo expressão elevada nas folhas de *C. arabica* IAC 62.



**Figura 2.** Mapa de calor de 21 metabólitos conhecidos significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre *C. stenophylla* e *C. arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC 62.

Com relação a análise metabolômica de folhas de *C. racemosa* e *C. arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC 62, foram detectados 220 compostos, sendo que 29 compostos identificados foram significantemente diferentes, sendo 14 com intensidades aumentadas e 15 com intensidades reduzidas em *C. racemosa*, quando comparado a *C. arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC 62. Dentre os metabólitos aumentados estão: ácido málico, ácido butanodióico, ácido isotreônic, ácido nonanoico, xilulose, maltotriose, ácido quínico, beta-xilopiranose, ácido glicérico, ácido succínico, ácido octadecanoico, ácido pentônico, glicerol, beta-talopiranose. Os metabólitos reduzidos encontrados foram ácido propanodióico, lixose, sorbose, manose, uridina 5'-difosfato-N-acetilglucosamina, iditol, glicose, ácido xilônico, diglicerol, arabinol, ácido hexanoico, triacontano, feniletilamina, ácido ribônico, desoxiglicose, 2-desoxiglicose.

Esses metabólitos identificados foram categorizados em classes distintas, incluindo compostos carboidratos, ácidos carboxílicos e ácidos graxos, juntamente com seus valores de FC correspondentes (Tabela 2).

**Tabela 2.** Metabólitos selecionados que diferiram significativamente entre folhas de *C. racemosa* e *C. arabica* IAC 62 (valor de  $p < 0,05$ ). Fold change (FC) representa a razão entre os valores de intensidade dos tratamentos, destacando alterações em abundância relativa.

**MONOSSACARÍDEOS**

COMPOSTO	FC <i>C. racemosa</i> / <i>C. arabica</i>	p-valor
<b>LIXOSE</b>	0,46381	0,042824
<b>ARABINOSE</b>	0,27493	0,008235
<b>XILULOSE</b>	20,757	0,000522
<b>SORBOSE</b>	0,59455	0,027805
<b>MANOSE</b>	0,57615	0,000149
<b>DESOXIGLICOSE</b>	0,44558	0,020242
<b>2-DESOXIGLICOSE</b>	0,4443	0,002959

**OLIGOSSACARÍDEOS**

	FC	p-valor
<b>MALTOTRIOSE</b>	20,226	0,001208

**FURANOSES E PIRANOSES (FORMAS CÍCLICAS DE AÇÚCARES)**

	FC	p-valor
<b>BETA-TALOPIRANOSE</b>	4,1885	0,000239
<b>BETA-XILOPIRANOSE</b>	6,2973	0,007017

**ÁCIDOS DERIVADOS DE CARBOIDRATOS**

	FC	p-valor
<b>ÁCIDO PENTÔNICO</b>	4,9417	0,000324

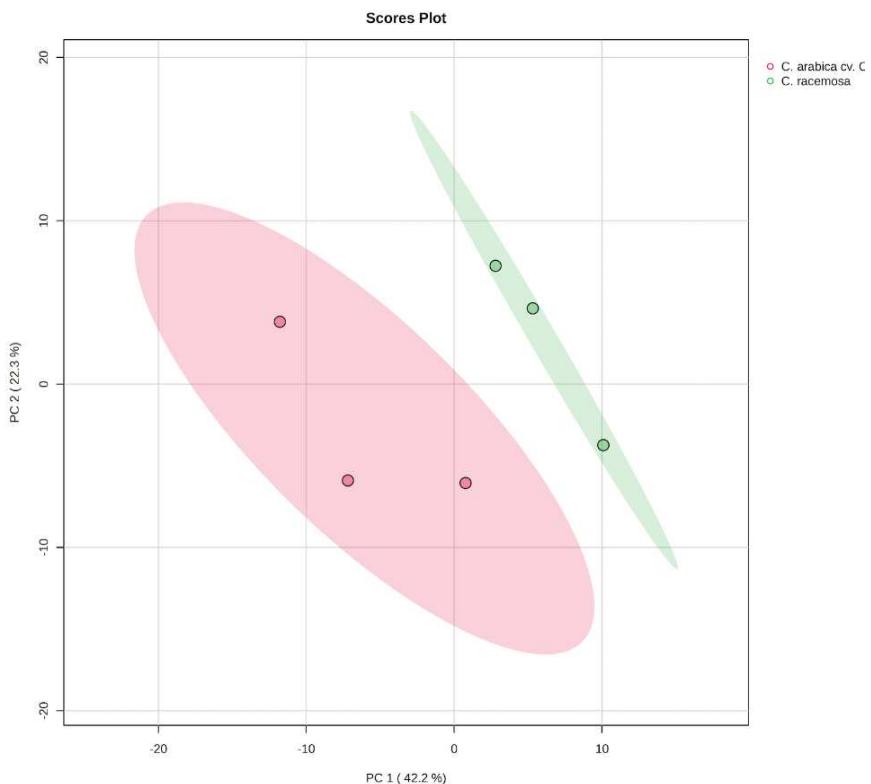
**ÁCIDOS CARBOXÍLICOS**

	FC	p-valor
<b>ÁCIDO GLICÉRICO</b>	5,6485	0,036881

ÁCIDO MÁLICO	141,59	0,000241
ÁCIDO BUTANODIÓICO	95,797	0,001491
ÁCIDO ISOTREÔNICO	61,014	0,000199
ÁCIDO QUÍNICO	9,2299	0,018016
ÁCIDO SUCCÍNICO	5,6385	0,001186
ÁCIDO OCTADECANOICO	4,948	0,000378
ÁCIDO PROPANODIÓICO	0,69856	0,035562
<b>ÁCIDOS GRAXOS</b>		
	<b>FC</b>	<b>p-valor</b>
ÁCIDO NONANOICO	6,579	0,037079
ÁCIDO OCTADECANOICO	2,7557	0,037741
ÁCIDO HEXANOICO	0,15899	0,014029
<b>POLIÁLCOOIS</b>		
	<b>FC</b>	<b>p-valor</b>
IDITOL	0,5521	0,001123
DIGLICEROL	0,28696	0,020091
ARABITOL	0,16612	0,0133
GLICEROL	4,3056	0,016985
<b>ÁCIDO DERIVADO DE CARBOIDRATO</b>		
ÁCIDO XILÔNICO	<b>FC</b>	<b>p-valor</b>
	0,40923	0,002322
<b>NUCLEOTÍDEO CONJUGADO / DERIVADO DE AÇÚCAR</b>		

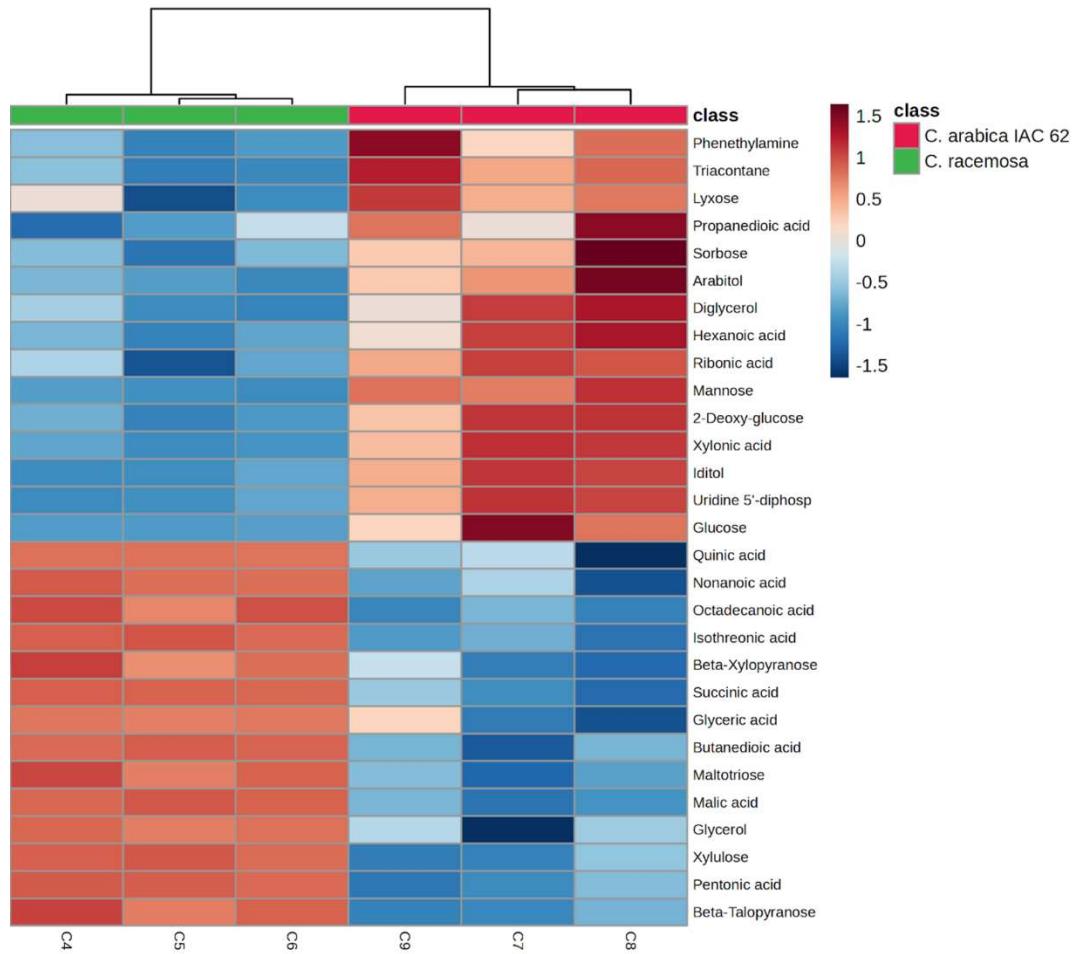
		FC	p-valor
<b>URIDINA</b>	<b>5'-</b>	0,55237	0,001118
<b>DIFOSFATO-N-</b>	<b>ACETILGLUCOSAMINA</b>		
		<b>AMINA (AMINA AROMÁTICA)</b>	
		FC	p-valor
<b>FENILETILAMINA</b>		0,12273	0.012851

A PCA evidenciou de forma clara a separação entre os perfis metabólicos das folhas de *C. racemosa* e *C. arabica* (Figura 3). O primeiro componente principal (PC1) explicou 42,2% da variância observada, enquanto o segundo componente (PC2) contribuiu com 22,3%, totalizando uma variância explicada cumulativa de 64,5%.



**Figura 3.** Pontuação PCA ilustrando a diferenciação de amostras de folha de *C. racemosa* e *C. arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC 62.

A Figura 4 apresenta 29 metabólitos com diferenças significativas, dos quais 14 exibiram níveis de expressão mais elevados nas folhas de *C. racemosa*, enquanto 15 mostraram maior expressão nas folhas de *C. arabica* cv. IAC 62.



**Figura 4.** Mapa de calor de 29 metabólitos conhecidos significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre *C. racemosa* e *C. arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC 62.

Neste trabalho, também foi realizado a análise de perfil metabolômico entre folhas de *Coffea arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC 62 e folhas de café do híbrido resistente IAC 1059 originado de um cruzamento entre *C. arabica* e *C. racemosa*. Foram detectados 220 compostos, sendo que sete compostos identificados foram significantemente diferentes, sendo seis com intensidades aumentadas e um com intensidade reduzida em IAC 1059, quando comparado a *C. arabica* IAC 62. Dentre os metabólitos aumentados estão: arabinose, maltotriose ácido glicólico, ácido láctico, ácido pentônico e ácido isotriônico. O carboidrato 2-desoxiglicose apresentou-se reduzido em IAC 1059.

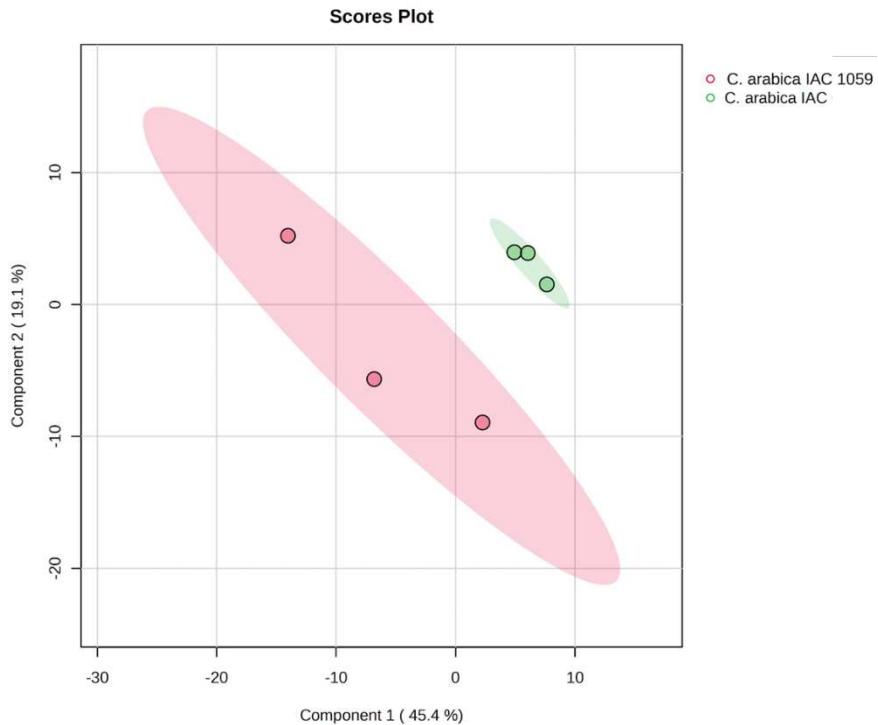
Esses metabólitos identificados foram categorizados em classes distintas, incluindo compostos carboidratos e ácidos orgânicos, juntamente com seus valores de FC correspondentes (Tabela 3).

**Tabela 3.** Metabólitos selecionados que diferiram significativamente entre folhas de café do híbrido resistente IAC 1059 e *C. arabica* IAC 62 (valor de  $p < 0,05$ ). Fold change (FC) representa a razão entre os valores de intensidade dos tratamentos, destacando alterações em abundância relativa.

**MONOSSACARÍDEOS**

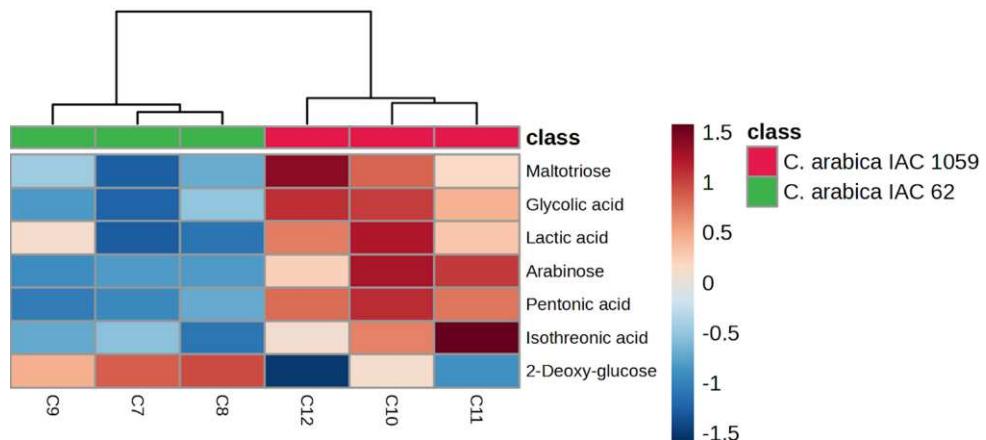
<b>COMPOSTO</b>	<b>FC</b>	<b>p-valor</b>
<b>IAC1059/IAC62</b>		
<b>ARABINOSE</b>	0,25727	0,005459
<b>MODIFICAÇÕES DE CARBOIDRATOS</b>		
	<b>FC</b>	<b>p-valor</b>
<b>2-</b> <b>DESOXIGLICOSE</b>	2,6369	0,037865
<b>OLIGOSSACARÍDEOS</b>		
	<b>FC</b>	<b>p-valor</b>
<b>MALTOTRIOSE</b>	0,090153	0,020099
<b>ÁCIDOS DERIVADOS DE CARBOIDRATOS</b>		
	<b>FC</b>	<b>p-valor</b>
<b>ÁCIDO</b> <b>PENTÔNICO</b>	0,08634	0,000309
<b>ÁCIDO</b> <b>ISOTRIÔNICO</b>	0,025289	0,026791
<b>ÁCIDOS ORGÂNICOS</b>		
	<b>FC</b>	<b>p-valor</b>
<b>ÁCIDO</b> <b>GLICÓLICO</b>	0,36399	0,004414
<b>ÁCIDO LÁCTICO</b>	0,12831	0,042429

A Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), revelou distinções metabólicas claras entre IAC 1059 e *C. arabica* IAC 62, com alta precisão de classificação (Figura 5). O primeiro componente principal (PC1) explicou 45,4% da variância observada, enquanto o segundo componente (PC2) contribuiu com 19,1%, totalizando uma variância explicada cumulativa de 64,5%.



**Figura 5.** Pontuação PLS-DA ilustrando a diferenciação de amostras de folha de do híbrido resistente IAC 1059 e *C. arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC 62.

O heatmap apresentou sete metabólitos com diferenças significativas, dos quais seis exibiram níveis de expressão mais elevados nas folhas de café do híbrido resistente IAC 1059, enquanto apenas um mostrou maior expressão nas folhas de *C. arabica* cv. IAC 62 (Figura 6).



**Figura 6.** Mapa de calor de sete metabólitos conhecidos significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre IAC 1059 e *C. arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC 62.

Por fim, foi realizada a análise metabolômica entre folhas de *C. racemosa* e o híbrido resistente IAC 1059. Foram detectados 220 metabólitos, sendo que 10 compostos identificados foram significantemente diferentes, sendo quatro com intensidades aumentadas e seis com intensidades reduzidas em *C. racemosa*, quando comparado a IAC 1059. Dentre os metabólitos

aumentados estão: beta-talopiranose, beta-xilopiranose, ácido nonanoico, e ácido octadecanoico. Os metabólitos reduzidos encontrados foram lixose, arabinose eritro-pentopiranose, turanose, ácido pentônico e ácido glicólico. Esses metabólitos identificados foram categorizados em classes distintas, incluindo compostos carboidratos e ácidos orgânicos, juntamente com seus valores de FC correspondentes (Tabela 4).

**Tabela 4.** Metabólitos selecionados que diferiram significativamente entre folhas de *C. racemosa* e 'IAC 1059 (valor de  $p < 0,05$ ). Fold change (FC) representa a razão entre os valores de intensidade dos tratamentos, destacando alterações em abundância relativa

**MONOSSACARÍDEOS**

<b>COMPOSTO</b>	<b>FC</b>	<b>p-valor</b>
<b>LIXOSE</b>	0,46381	0,042824
<b>ARABINOSE</b>	0,27493	0,008235

**FURANOSES E PIRANOSES (FORMAS CÍCLICAS DE AÇÚCARES)**

	<b>FC</b>	<b>p-valor</b>
<b>BETA-TALOPIRANOSE</b>	6,8216	0,04312
<b>BETA-XILOPIRANOSE</b>	4,1751	0,020814
<b>ERITRO-PENTOPIRANOSE</b>	0,22806	0,036542

**DISSACARÍDEOS**

	<b>FC</b>	<b>p-valor</b>
<b>TURANOSE</b>	0,10996	0,038926

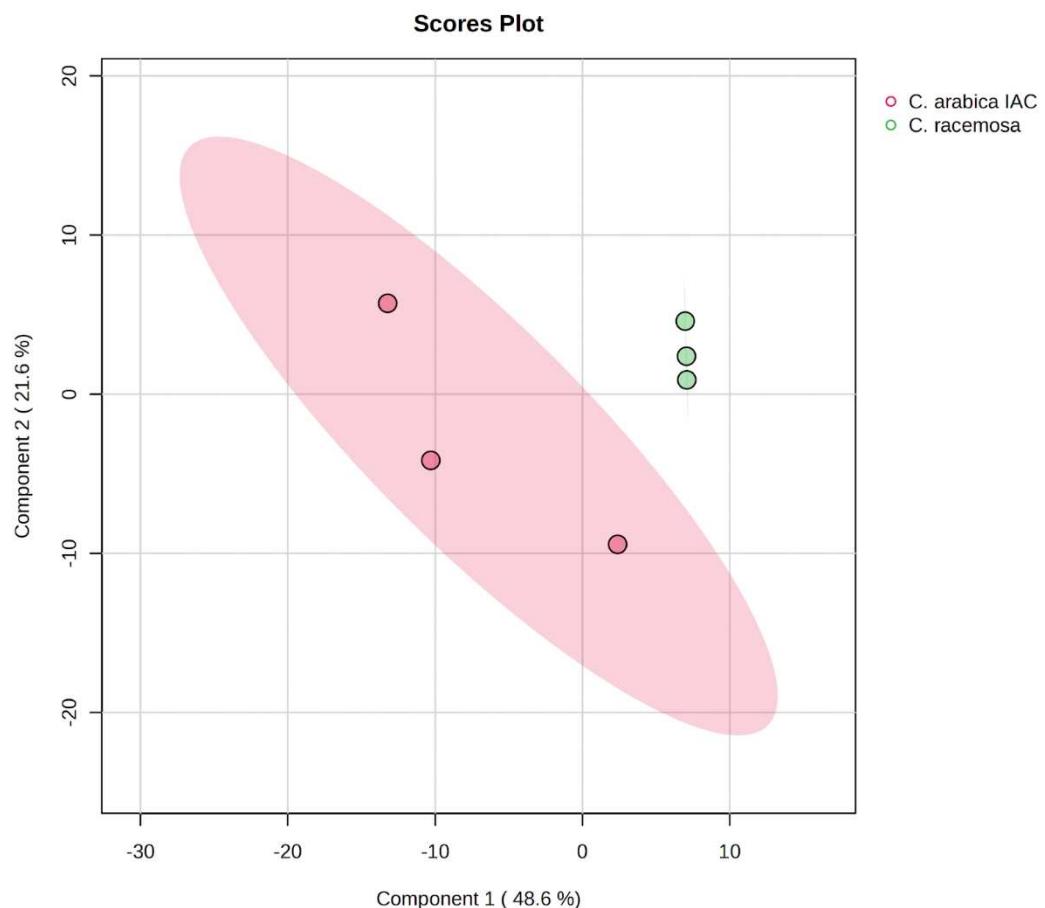
**ÁCIDOS DERIVADOS DE CARBOIDRATOS**

	<b>FC</b>	<b>p-valor</b>
<b>ÁCIDO PENTÔNICO</b>	0,42622	0,006449

**ÁCIDOS CARBOXÍLICOS**

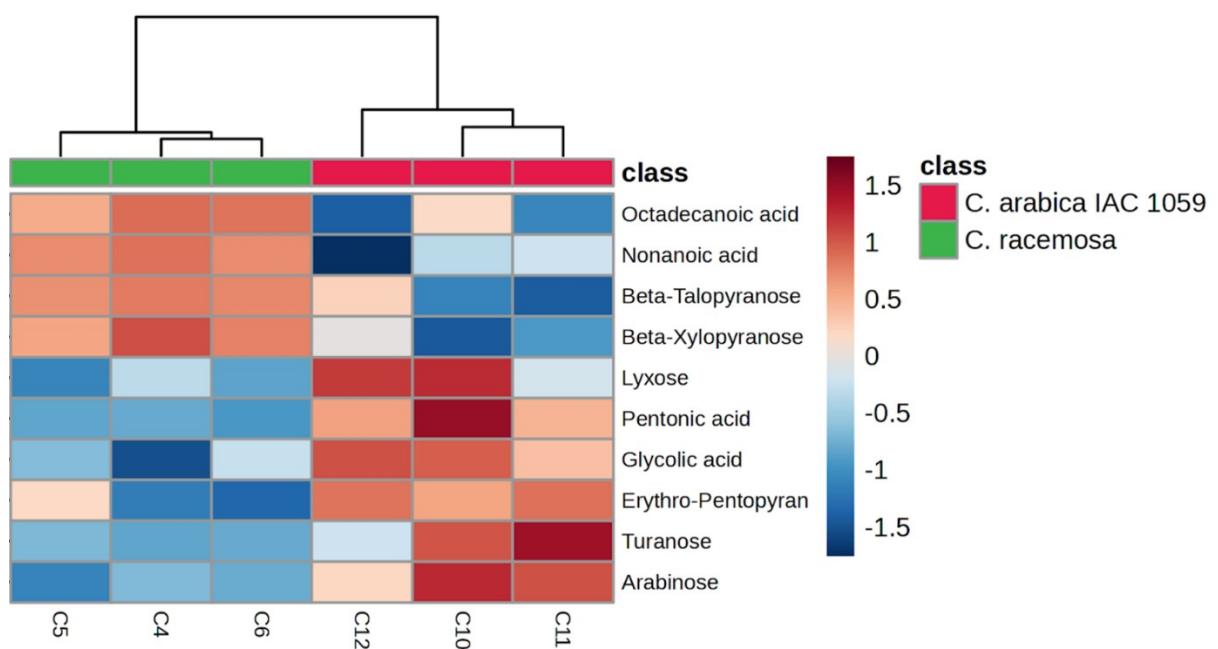
	FC	p-valor
<b>ÁCIDO GLICÓLICO</b>	0,38965	0,019109
<b>ÁCIDOS GRAXOS</b>		
<b>ÁCIDO NONANOICO</b>	6,579	0,037079
<b>ÁCIDO OCTADECANOICO</b>	2,7557	0,037741

A PLS-DA mostrou diferenças entre os perfis metabólicos das folhas de *C. racemosa* e IAC 1059 (Figura 7). O primeiro componente principal (PC1) explicou 48,6% da variância observada, enquanto o segundo componente (PC2) contribuiu com 21,6%, totalizando uma variância explicada cumulativa de 70,2%.



**Figura 7.** Pontuação PLS-DA ilustrando a diferenciação de amostras de folha de *C. racemosa* e 'Siriema' IAC 1059.

A Figura 8 apresenta 10 metabólitos com diferenças significativas, dos quais quatro exibiram níveis de expressão mais elevados nas folhas de *C. racemosa*, enquanto 6 mostraram maior expressão nas folhas do híbrido resistente IAC 1059.



**Figura 8.** Mapa de calor de sete metabólitos conhecidos significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre *C. racemosa* e IAC 1059.

### 3.4 Discussão

A análise metabolômica comparativa entre diferentes genótipos de cafeeiros resultou na identificação e categorização de 58 compostos significativamente distintos. Esses metabólitos apresentaram padrões bioquímicos diferenciados, associados a respostas a estresses bióticos e abióticos, fornecendo pistas relevantes sobre os mecanismos metabólicos envolvidos na defesa contra insetos.

As folhas de *C. stenophylla* e *C. racemosa*, reconhecidamente resistentes ao bicho-mineiro (Guerreiro-Filho, 2006), apresentaram perfis metabólicos claramente distintos em relação à *C. arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC 62, suscetível ao ataque da praga. As análises de componentes principais (PCA) confirmaram essas diferenças, com separações bem definidas nos mapas de pontuação. As variações nos perfis foram explicadas principalmente pelos compostos das classes de ácidos orgânicos, açúcares e álcoois de açúcar (polialcoois).

Em ambos os genótipos resistentes (*C. stenophylla* e *C. racemosa*), observou-se um acúmulo significativo de ácido málico, ácido succínico (butanodióico), ácido isotreônico e ácido quínico — compostos amplamente relacionados a funções de defesa vegetal, ajuste osmótico, quelação de íons metálicos e sinalização de estresse oxidativo (Panchal; Miller; Giri, 2021). O metabolismo desses ácidos orgânicos é essencial para o funcionamento celular das plantas, participando de rotas bioquímicas fundamentais como a geração de energia, o equilíbrio de oxidação-redução (redox) e a síntese de precursores para aminoácidos e outros metabólitos secundários (López-Bucio et al., 2000).

O ácido málico, por exemplo, é um intermediário chave do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), contribuindo para a respiração mitocondrial, o transporte de íons e a regulação do pH celular. De forma semelhante, o ácido succínico também integra o ciclo TCA, desempenhando um papel importante na transferência de elétrons e na manutenção do metabolismo energético, especialmente sob condições de estresse (Panchal; Miller; Giri, 2021).

O ácido isotreônico, embora menos estudado em espécies cultivadas, é um metabólito derivado da via do ácido mevalônico e tem sido associado à proteção contra estresses bióticos. Na análise metabolômica comparativa das folhas de *C. racemosa*, *C. stenophylla* e do híbrido resistente IAC 1059, observamos um acúmulo significativo desse composto, sugerindo um possível envolvimento na resposta de defesa dessas plantas frente ao ataque do bicho-mineiro.

Esse achado encontra respaldo em estudos realizados com a palmeira-das-canárias (*Phoenix canariensis*), nos quais o perfil metabólico foliar foi analisado em diferentes estágios de infestação por escaravelho-vermelho, *Rhynchophorus ferrugineu* (Coleoptera: Curculionidae). Utilizando uma abordagem metabolômica baseada em cromatografia gasosa (CG), os autores observaram que o metaboloma das folhas variou significativamente entre plantas saudáveis e aquelas nos estágios iniciais e avançados do ataque. No primeiro estágio, houve uma reprogramação acentuada do metabolismo de carboidratos e ácidos orgânicos. A análise de enriquecimento metabolômico revelou que o ataque afeta seletivamente um grupo específico de compostos, sem necessariamente reorganizar amplamente as vias metabólicas. Entre os compostos diferencialmente acumulados durante o primeiro estágio do ataque, destacam-se precursores da biossíntese de fenilpropanoides, terpenoides e alcaloides, como a fenilalanina, triptofano, celobiose, xilose, quinato, xilonite, idonato, iso-treonato, celobiitol e arbutina. A presença aumentada de iso-treonato, em especial, reforça sua possível atuação como marcador de resposta precoce a estresses bióticos (Giovino; Martinelli; Saia, 2015) .

Assim, a elevação do ácido isotreônico em *C. racemosa*, *C. stenophylla* e no híbrido IAC 1059 pode indicar que essas plantas possuem mecanismos de defesa ativados mesmo na ausência de sintomas aparentes, refletindo uma adaptação metabólica que favorece a resistência. Esses dados

sugerem que o isotreônico, assim como o iso-treonato observado no estudo com *P. canariensis*, pode atuar como um biomarcador relevante na resposta inicial ao estresse por herbivoria.

Além do ácido isotreônico, outro metabólito relevante identificado nas análises foi o ácido quínico, um álcool-ácido cíclico, que também apresentou acúmulo nas folhas de *C. stenophylla*, *C. racemosa* e no híbrido resistente IAC 1059. O ácido quínico é um intermediário fundamental da rota do ácido chiquímico, diretamente envolvido na biossíntese de compostos fenólicos. Ele se combina com o ácido cafeico formando os ácidos clorogênicos, além de outros derivados da via dos fenilpropanoides (Ramiro; Guerreiro-Filho; Mazzafera, 2006). Essa rota metabólica tem papel central na defesa das plantas contra insetos herbívoros, atuando tanto como barreira química quanto como sinalizadora da ativação de respostas de defesa.

Os ácidos clorogênicos, em especial, são reconhecidos por sua ampla atuação na resistência vegetal. Esses compostos exercem efeito antialimentar e tóxico sobre diversos insetos-praga, além de atuarem como antioxidantes, reduzindo o dano oxidativo causado durante o ataque biótico (Ramiro; Guerreiro-Filho; Mazzafera, 2006).

O acúmulo de ácido quínico nesses genótipos reforça a hipótese de que essas plantas possuem uma predisposição metabólica voltada à resistência biótica, especialmente contra o bicho-mineiro. Assim como observado no estudo com *P. canariensis*, em que compostos como o quinato e isotreonato foram apontados como marcadores de resposta inicial ao ataque (Giovino; Martinelli; Saia, 2015), a presença do ácido quínico em *Coffea* pode indicar uma ativação precoce das vias de biossíntese de fenilpropanoides, conferindo uma vantagem adaptativa frente ao estresse por herbivoria (Giovino; Martinelli; Saia, 2015).

Além do acúmulo de ácido isotreônico e ácido quínico observado nas análises metabolômicas das folhas de *C. racemosa*, *C. stenophylla* e do híbrido IAC 1059, também foi detectado um aumento nos níveis de maltotriose. A maltotriose, um oligossacarídeo resultante da degradação parcial do amido, pode representar um traço metabólico constitutivo nesses genótipos, refletindo uma predisposição fisiológica voltada à prontidão metabólica. Mesmo na ausência de estresse biótico evidente, a presença aumentada desse composto pode indicar um estado de preparação metabólica para rápidas respostas diante de desafios ambientais, funcionando como reserva energética acessível e potencial modulador de vias de defesa (Moghaddam; Van Den Ende, 2012). Além disso, a maltotriose pode contribuir para o equilíbrio osmótico e atuar na sinalização metabólica, favorecendo a ativação mais eficiente de mecanismos de resistência quando necessário. Assim, seu acúmulo pode estar associado a uma estratégia preventiva de defesa, comum em plantas mais tolerantes ou adaptadas a ambientes com pressão constante de herbivoria (Rolland; Baena-Gonzalez; Sheen, 2006).

Além disso, observou-se uma redução consistente em metabólitos como manose, ribose, arabinol e diglicerol nas folhas dos genótipos resistentes *C. stenophylla* e *C. racemosa*. Isso pode indicar uma reorientação do metabolismo primário para vias secundárias relacionadas à defesa. A diminuição de açúcares de reserva ou estruturais pode refletir uma alocação de carbono preferencial para a biossíntese de compostos fenólicos ou terpenoides de defesa (Smith, 2005).

A presença de manose nas folhas pode ter implicações relevantes na interação planta-inseto. Por ser um carboidrato estruturalmente semelhante à glicose, a manose pode ser metabolizada por alguns insetos herbívoros que possuem a enzima manose-fosfato isomerase, a qual converte manose-6-fosfato em frutose-6-fosfato, integrando-a às vias metabólicas centrais (De La Fuente; Peñas; Sols, 1986). No entanto, em plantas resistentes, a redução nos níveis de manose pode atuar como um fator de desestímulo à alimentação e à oviposição, uma vez que tecidos com menor teor de açúcares assimiláveis tendem a ser menos atrativos ou nutricionalmente adequados para os insetos herbívoros (Li et al., 2020).

A análise do híbrido IAC 1059, oriundo do cruzamento entre *C. arabica* (susceptível) e *C. racemosa* (resistente), revelou um perfil metabólico parcialmente herdado da espécie resistente, evidenciado pelo aumento de compostos como ácido isotreônico, ácido pentanoico e maltotriose — todos potencialmente envolvidos em mecanismos de defesa.

O ácido pentanoico, também conhecido como ácido valérico, é um ácido graxo de cadeia curta que tem despertado interesse por seu potencial papel nas defesas naturais das plantas. No contexto da proteção de plantas, esse composto vem sendo apontado como uma alternativa promissora para o controle de pragas. Segundo Krzyżowski et al., (2020), o ácido valérico apresentou propriedades protetoras significativas contra a infestação do besouro *Callosobruchus maculatus* em sementes de feijão. No estudo, o composto foi testado de duas formas: como agente fumigante e por contato direto. A aplicação de 4 microlitros do ácido causou 100% de mortalidade dos insetos após 48 horas no ensaio fumigante, e 100% de mortalidade em apenas 24 horas no ensaio de contato direto. Além disso, observou-se que o ácido pode exercer efeito inibitório sobre enzimas digestivas e afetar a integridade das membranas celulares, reforçando sua ação inseticida.

Nesse contexto, a detecção do ácido pentanoico em folhas de *C. racemosa* e do híbrido IAC 1059, mesmo sob condições naturais e na ausência de estresse induzido, pode estar associada a um perfil metabólico constitutivamente defensivo. Essa presença pode contribuir para a menor atratividade ou maior tolerância dessas plantas ao ataque do bicho-mineiro, funcionando como parte de uma barreira química eficaz. Dessa forma, o acúmulo de ácido pentanoico pode ser considerado um possível marcador bioquímico de resistência, com potencial aplicação na seleção de genótipos tolerantes a pragas.

Observou-se também uma redução nos níveis de 2-desoxiglicose tanto em *C. racemosa* quanto no híbrido IAC 1059, ambos genótipos reconhecidamente resistentes ao bicho-mineiro. A 2-desoxiglicose (2-DOG) é um análogo da glicose que, ao ser absorvido pelas células vegetais, é fosforilado pela hexoquinase formando 2-DOG-6-fosfato (2-DOG-6-P). Esse metabólito atua como um competidor da glicose-6-fosfato e é conhecido por causar disfunções metabólicas significativas. Estudos demonstram que o acúmulo de 2-DOG-6-P pode inibir a glicólise, prejudicar a síntese de proteínas, interferir na glicosilação de proteínas e comprometer a formação de polissacarídeos da parede celular — efeitos que, em conjunto, impactam negativamente o crescimento e o desenvolvimento vegetal (Kunze et al., 2001).

Nesse contexto, a menor abundância de 2-DOG observada em *C. racemosa* e IAC 1059 pode representar um mecanismo adaptativo, evitando os efeitos deletérios associados ao acúmulo deste composto. Essa redução pode favorecer a integridade do metabolismo primário e contribuir para uma resposta mais eficiente ao estresse biótico, como o causado pelo ataque do bicho-mineiro.

Além dos efeitos já descritos para o ácido pentanoico, estudos vêm destacando o potencial inseticida de outros ácidos graxos de cadeia curta e média sobre insetos herbívoros. Em experimento conduzido em laboratório para avaliar a toxicidade de diferentes ácidos graxos sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), foram testados os ácidos pentanoico, decanoico, hexanoico, nonanoico, octanoico, aplicados sobre dieta artificial. Os resultados demonstraram que os ácidos nonanoico (82,9%) e octanoico (55,2%) foram os mais eficazes na mortalidade de *S. frugiperda*, enquanto o ácido nonanoico também se destacou por causar significativa redução no crescimento larval, evidenciando seu impacto no desenvolvimento do inseto (Gabriel et al., 2004). Esses achados reforçam a versatilidade e o potencial inseticida dos ácidos graxos, que atuam não apenas como agentes letais, mas também como inibidores do crescimento, representando uma estratégia promissora para o manejo sustentável de pragas agrícolas.

Por outro lado, o contraste entre *C. racemosa* e o híbrido IAC 1059 evidenciou que, embora este última compartilhe certos metabólitos com a espécie resistente, há também perdas relevantes, como o menor acúmulo de ácidos graxos (por exemplo, ácido nonanoico e ácido octadecanoico) e de açúcares cílicos, como a  $\beta$ -xilopiranose. Este monossacarídeo, derivado da xilose — componente estrutural da hemicelulose — está associado ao reforço da parede celular, dificultando a penetração e alimentação de patógenos e insetos herbívoros (Moura et al., 2021). A presença de  $\beta$ -xilopiranose pode refletir uma estratégia metabólica preventiva, na qual a planta mantém compostos estruturais e sinalizadores em níveis capazes de desencorajar a alimentação e o estabelecimento de pragas, contribuindo para a resistência observada nos genótipos

analizados (Ramírez Orduña; Gonzalo Ramírez Lozano; López Gutiérrez, 2002). Esses achados sugerem que a resistência em IAC 1059 pode ser parcial, possivelmente refletindo uma expressão intermediária de genes de defesa herdados de seus parentais.

Os dados apresentados reforçam a importância dos ácidos orgânicos e açúcares funcionais como marcadores químicos de resistência ao bicho-mineiro em cafeeiros. Genótipos resistentes acumulam compostos com potencial bioativo e de sinalização que podem interferir direta ou indiretamente no ciclo de vida do inseto-praga. A utilização dessas informações pode subsidiar estratégias de melhoramento genético, guiando a seleção de progêneres com maior potencial de defesa metabólica.

### 3.5 Conclusão

A análise metabolômica comparativa entre diferentes genótipos de cafeiro, incluindo *C. arabica* cv. Catuáí Amarelo IAC 62, *C. racemosa*, *C. stenophylla* e o híbrido resistente IAC 1059, permitiu identificar assinaturas químicas associadas à resistência ao bicho-mineiro. Os genótipos resistentes (*C. racemosa* e *C. stenophylla*) apresentaram acúmulo significativo de ácidos orgânicos como ácido málico, ácido succínico, ácido isotreônico e ácido quínico — compostos relacionados a funções de defesa, como acidificação do ambiente celular, quelação de íons metálicos e sinalização de estresse oxidativo.

O híbrido resistente IAC 1059 revelou um perfil metabolômico intermediário, herdando parcialmente os compostos de defesa da espécie resistente *C. racemosa*, incluindo o aumento de metabólitos como ácido isotreônico, ácido glicólico, ácido pentanóico e maltotriose. Este resultado reforça a hipótese de que características químicas associadas à resistência podem ser transmitidas por hibridação, ainda que de maneira incompleta.

Além disso, a redução da 2-desoxiglicose (2-DOG) observada tanto em *C. racemosa* quanto em IAC 1059, mas não em *C. arabica*, indica que a regulação negativa desse metabólito pode representar um marcador de segregação genética relacionado à resistência. Considerando que a 2-DOG-6-fosfato interfere negativamente em processos celulares essenciais, como a glicólise, a síntese proteica e a formação da parede celular, sua redução pode representar uma estratégia metabólica adaptativa para preservar a integridade celular sob estresse.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A integração dos dados metabolômicos com a caracterização dos fungos endofíticos isolados de *Coffea racemosa* e *C. stenophylla* sugere uma possível relação entre os perfis químicos diferenciados desses genótipos resistentes e a presença de microrganismos mutualistas com potencial entomopatogênico. Dentre os isolados, destacou-se um fungo do gênero *Colletotrichum*, obtido a partir de *C. stenophylla*, que apresentou alta virulência sobre *Tenebrio molitor*, causando até 70% de mortalidade em apenas cinco dias. Ensaios em placa revelaram que a ação entomopatogênica desse isolado resultou de efeito sinérgico entre conídios submersos, metabólitos fúngicos e hifas, evidenciando a complexidade e a eficiência do mecanismo de infecção. A produção de quitinase por esse isolado reforça seu potencial de degradação da cutícula de insetos, contribuindo diretamente para sua atividade entomopatogênica. Como fungos ascomicetos são reconhecidos por sua capacidade de produzir uma ampla gama de metabólitos secundários bioativos, é plausível supor que tais compostos também desempenhem papéis essenciais no estabelecimento do endofitismo e na defesa indireta da planta contra herbívoros. Nesse contexto, os metabólitos como ácido málico, ácido quínico e maltotriose, comumente acumulados nos genótipos resistentes, podem não apenas refletir respostas fisiológicas da planta, mas também estar associados a interações benéficas com endófitos como o *Colletotrichum*, fortalecendo a resistência sistêmica contra o bicho-mineiro. Esses achados reforçam a importância de abordagens integradas para compreender os mecanismos de resistência em plantas, fornecendo subsídios valiosos para o desenvolvimento de estratégias de controle biológico e programas de melhoramento genético voltados à sustentabilidade na cafeicultura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHSAN, S. M. *et al.* Plant–Entomopathogenic Fungi Interaction: Recent Progress and Future Prospects on Endophytism-Mediated Growth Promotion and Biocontrol. **Plants**, v. 13, n. 10, p. 1420, 20 maio 2024. <https://doi.org/10.3390/plants13101420>

AKELLO, Juliet *et al.* Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). **Journal of invertebrate pathology**, v. 96, n. 1, p. 34–42, set. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.004>

ALI, S.; REN, S.; HUANG, Z. Purification of enzymes related to host penetration and pathogenesis from entomopathogenic fungi. **Biology, Environmental Science, Chemistry**, p. 15–22, 2010.

ALI, Shaukat; HUANG, Zhen; REN, Shun X. Production and extraction of extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Isaria fumosoroseus* (Cordycipitaceae; Hypocreales). **Biocontrol Science and Technology**, v. 19, n. 1, p. 81–89, jan. 2009. <https://doi.org/10.1080/09583150802588524>

ALMEIDA, Juliana Dantas de *et al.* Bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*): uma revisão sobre o inseto e perspectivas para o manejo da praga. **Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 372, 2020.

ALVES, Dejane Santos *et al.* Extrato de *Coffea* racemosa como alternativa no controle do bicho-mineiro do cafeiro. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 35, n. 2, p. 250–258, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000200004>

ANTOINE, Gaëlle *et al.* Diterpenes of *Coffea* seeds show antifungal and anti-insect activities and are transferred from the endosperm to the seedling after germination. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 194, n. July 2022, p. 627–637, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.12.013>

ARAÚJO, W. L. *et al.* **Micro-organismos Endofíticos: Aspectos Teóricos e Práticos de Isolamento e Caracterização**. 1. ed. Santarém: Editora UFOPA, 2014.

ARNOLD, A. Elizabeth *et al.* Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 26, p. 15649–15654, 23 dez. 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.2533483100>

AUSUBEL, Frederick M. *et al.* Current Protocols in Molecular Biology Kevin Struhl (eds.) Current Protocols in Molecular Biology. 2003.

BALDIN, Edson Luiz Lopes; VENDRAMIN, José Djair; LOURENÇÂO, André Luiz. **Resistência de plantas a insetos: fundamentos e aplicações**. Piracicaba: FEALQ, 2019.

BARBEHENN, Raymond V.; PETER CONSTABEL, C. Tannins in plant–herbivore interactions. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1551–1565, 1 set. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.040>

BING, Lori Anderson; LEWIS, Leslie C. Occurrence of the entomopathogen Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin in different tillage regimes and in Zea mays L. and virulence towards Ostrinia nubilalis (Hübner). **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 45, n. 1–2, p. 147–156, 1 maio 1993. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(93\)90065-W](https://doi.org/10.1016/0167-8809(93)90065-W)

BRASIL MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. **Brasil é o maior produtor mundial e o segundo maior consumidor de café**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/brasil-e-o-maior-produtor-mundial-e-o-segundo-maior-consumidor-de-cafe#:~:text=Segundo%20a%20Organiza%cc%87o%20Internacional%20do,atr%cc%81s%20s%20mente%20dos%20Estados%20Unidos>>.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, n. 1, p. 2–9, 1988. <https://doi.org/10.2307/1943154>

CARVALHO, C. H. S. de. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. 1. ed. DF, Brasília: Embrapa, 2008.

CEJA-NAVARRO, Javier A. *et al.* Gut microbiota mediate caffeine detoxification in the primary insect pest of coffee. **Nature Communications**, v. 6, n. May, p. 1–9, 2015. <https://doi.org/10.1038/ncomms8618>

CESNIK, Roberto; FERRAZ, José M. Guzman. *Orthezia praelonga* Douglas, 1891 (Hemiptera, Ortheziidae): biologia, controle químico e biológico. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPMA)**, 2000.

CHELICO, Linda; KHACHATOURIANS, George G. Isolation and characterization of nucleotide excision repair deficient mutants of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 98, n. 1, p. 93–100, maio 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.10.006>

CHEPLICK, Gregory P.; CLAY, Keith. Acquired Chemical Defences in Grasses: The Role of Fungal Endophytes. **Oikos**, v. 52, n. 3, p. 309, jun. 1988. <https://doi.org/10.2307/3565204>

CHERRY, Andy J. *et al.* Suppression of the stem-borer *Sesamia calamistis* (Lepidoptera; Noctuidae) in maize following seed dressing, topical application and stem injection with African isolates of *Beauveria bassiana*. **International Journal of Pest Management**, v. 50, n. 1, p. 67–73, jan. 2004. <https://doi.org/10.1080/09670870310001637426>

CLAY, Keith. Clavicipitaceous endophytes of grasses: Their potential as biocontrol agents. **Mycological Research**, v. 92, n. 1, p. 1–12, 1 jan. 1989. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(89\)80088-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(89)80088-7)

CLIFFORD, M. N. *et al.* The chlorogenic acids content of coffee substitutes. **Food Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 99–107, 1 jan. 1987. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(87\)90042-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(87)90042-2)

COLEN, Gecernir; JUNQUEIRA, Roberto Gonçalves; MORAES-SANTOS, Tasso. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 8, p. 881–885, 7 ago. 2006. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9118-9>

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira 2023/2024. **Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB)**, v. 11, n. 2318 6852, p. 110, 2024.

CORREIA, Lilian Cherubin. **Estudo metabolômico de genótipos de café resistentes ou suscetíveis ao bicho-mineiro-do-cafeeiro (Leucoptera coffeella)**. Tese—Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2021.

COSTA, Daniel C. M. *et al.* Characterization and levels of resistance in Coffea arabica × Coffea racemosa hybrids to Leucoptera coffeella. **Journal of Pest Science**, v. 98, n. 2, p. 1075–1084, 9 mar. 2025. <https://doi.org/10.1007/s10340-024-01844-4>

DAMBOLENA, José S. *et al.* Terpenes: Natural Products for Controlling Insects of Importance to Human Health—A Structure-Activity Relationship Study. **Psyche**, v. 2016, p. 4595823, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4595823>

DARBELLO, Daniel de Menezes. **Caracterização de cafeeiros resistentes e suscetíveis ao bicho-mineiro por meio de marcadores identificados por ressonância magnética nuclear e quimiometria**. Campinas, SP.: Instituto Agronômico de Campinas (IAC), abr. 2011.

DAVIS, Aaron P. *et al.* An annotated taxonomic conspectus of the genus Coffea (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, n. 4, p. 465–512, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x>

DAVIS, Aaron P. *et al.* High extinction risk for wild coffee species and implications for coffee sector sustainability. **Science advances**, v. 5, n. 1, p. 16 jan. 2019. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav3473>

DAVIS, Aaron P. *et al.* Lost and Found: Coffea stenophylla and C. affinis, the Forgotten Coffee Crop Species of West Africa. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. May, p. 1–18, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00616>

DE LA FUENTE, Mónica; PEÑAS, Pablo F.; SOLS, Alberto. Mechanism of mannose toxicity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 140, n. 1, p. 51–55, 15 out. 1986. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(86\)91056-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(86)91056-9)

DEL CARMEN H. RODRÍGUEZ, María *et al.* New species and records of Trichoderma isolated as mycoparasites and endophytes from cultivated and wild coffee in Africa. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–30, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84111-1>

DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I. *et al.* Resíduos de tiametoxam, aldicarbe e de seus metabólitos em folhas de cafeiro e efeito no controle de Leucoptera coffeella (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera:

Lyonetiidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 2, p. 257–263, 2006.  
<https://doi.org/10.1590/S1519-566X2006000200016>

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.

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

FARIA, Claudia Maria Xavier; INÁCIO, Carlos Antônio. Considerações sobre o gênero Colletotrichum. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 131, p. 131–147, 10 dez. 2023.  
<https://doi.org/10.31976/0104-038321v290006>

FELTON, G. W. *et al.* Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. **Journal of chemical ecology**, v. 15, n. 12, p. 2667–2694, dez. 1989. <https://doi.org/10.1007/BF01014725>

FERRÃO, Romário Gava *et al.* **Café Conilon**. Vitória: Incaper, 2017.

FRAGOSO, D. B. *et al.* Insecticide use and organophosphate resistance in the coffee leaf miner Leucoptera coffeella. **Bulletin of Entomological Research**, v. 92, n. 3, p. 203–212, 2002.  
<https://doi.org/10.1079/BER2002156>

FREEMAN, S.; HOROWITZ, S.; SHARON, A. Pathogenic and Nonpathogenic Lifestyles in Colletotrichum acutatum from Strawberry and Other Plants. **Phytopathology**, v. 91, n. 10, p. 986–992, 2001. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.10.986>

GABRIEL, P. *et al.* Potencial inseticida de ácidos graxos em relação a Spodoptera frugiperda. **Agropecuária; resumos**, 2004.

GALLO, D. *et al.* **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002.

GEOFFRY, Kiptoo; ACHUR, Rajeshwara N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 241–253, 1 abr. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.009>

GIOVINO, Antonio; MARTINELLI, Federico; SAIA, Sergio. Rhynchophorus ferrugineus attack affects a group of compounds rather than rearranging Phoenix canariensis metabolic pathways. **Available online on Sept**, v. 58, p. 388–396, 2015. <https://doi.org/10.1111/jipb.12430>

GOPINATH, Subash C. B.; ANBU, Periasamy; HILDA, Azariah. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, v. 46, n. 2, p. 119–126, 2005. <https://doi.org/10.1007/S10267-004-0221-9>

GRAZIOSI, Ignazio; RIESKE, Lynne K. A plant pathogen causes extensive mortality in an invasive insect herbivore. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 17, n. 4, p. 366–374, 1 nov. 2015. <https://doi.org/10.1111/afe.12116>

GREENFIELD, Melinda *et al.* Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. **Biological control: theory and applications in pest management**, v. 95, p. 40–48, 1 abr. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.002>

GREIF, M. D.; CURRAH, R. S. Patterns in the occurrence of saprophytic fungi carried by arthropods caught in traps baited with rotted wood and dung. **Mycologia**, v. 99, n. 1, p. 7–19, jan. 2007. <https://doi.org/10.1080/15572536.2007.11832595>

GUERREIRO FILHO, Oliveiro; MAZZAFERA, Paulo. Caffeine does not protect coffee against the leaf miner Perileucoptera coffeella. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 6, p. 1447–1464, 2000.

GUERREIRO FILHO, Oliveiro; MEDINA FILHO, Herculano Penna; CARVALHO, Alcides. Fontes de resistência ao bicho-mineiro, Perileucoptera coffeella, em Coffea spp. **Bragantia**, v. 50, n. 1, p. 45–55, 1991. <https://doi.org/10.1590/S0006-87051991000100006>

GUERREIRO-FILHO, Oliveiro. Coffee leaf miner resistance. **Braz. J. Plant Physiol**, v. 18, n. 1, p. 109–117, 2006. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100009>

HANKIN, Lester; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597, maio 1975.  
<https://doi.org/10.1080/00275514.1975.12019782>

HARTLEY, Sue E.; GANGE, Alan C. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. **Annual review of entomology**, v. 54, p. 323–342, jan. 2009.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090614>

HIGGINS, K. Lindsay *et al.* Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 42, n. 2, p. 543–555, fev. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.07.012>

HILLIS, David M.; DIXON, Michael T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly review of biology**, v. 66, n. 4, p. 411–446, 1991.  
<https://doi.org/10.1086/417338>

HIRUMA, Kei *et al.* A fungal sesquiterpene biosynthesis gene cluster critical for mutualist-pathogen transition in *Colletotrichum tofieldiae*. **Nature communications**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40867-w>

HOBER, E. Types and classification of resistance. In: MAXWELL, F. G.; JENNINGS, P. R. (Orgs.). **Breeding Plants Resistant to Insects**. New York: John Wiley, 1980. p. 15–21.

HUANG, WY *et al.* Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. **Fungal Diversity**, v. 33, p. 61–75, 2008.

HUARTE-BONNET, Carla *et al.* Alkane-grown *Beauveria bassiana* produce mycelial pellets displaying peroxisome proliferation, oxidative stress, and cell surface alterations. **Fungal biology**, v. 122, n. 6, p. 457–464, 1 jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.09.003>

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION'S (IOC). **COFFEE DEVELOPMENT REPORT 2022-23 BEYOND COFFEE Towards a Circular Coffee Economy A flagship publication of the International Coffee Organization.** Disponível em:

<<https://www.icocoffee.org/documents/cy2024-25/coffee-development-report-2022-23.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2025.

KARBAN, Richard; KUĆ, Joseph. Induced Resistance Against Pathogens and Herbivores: An Overview. In: AGRAWAL, nurag A.; TUZUN, Sadik; BENT, Elizabeth (Orgs.). **Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores: Biochemistry, Ecology, and Agriculture**. St. Paul, Minnesota (USA): American Phytopathological Society Press, 1999. p. 390.

KONNOROVA, E.; DE LA VEJA, A. Características y dimensiones de las lesiones producidas a las hojas del cafeto. **Café y Cacao**, v. 7, n. 1, p. 25–40, 1985.

KRZYŻOWSKI, Michał *et al.* The short-chain fatty acids as potential protective agents against *Callosobruchus maculatus* infestation. **Journal of Stored Products Research**, v. 86, p. 101570, 1 mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101570>

KUNZE, Irene *et al.* 2-Deoxyglucose resistance: A novel selection marker for plant transformation. **Molecular Breeding**, v. 7, n. 3, p. 221–227, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1011307508252>

LARA, Fernando M. **Princípios de Resistência das Plantas a Insetos**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991.

LECKIE, Brian Michael. **Effects of Beauveria bassiana mycelia and metabolites incorporated into synthetic diet and fed to larval Helicoverpa zea; and detection of endophytic Beauveria bassiana in tomato plants using PCR and ITS primers**. Master—Knoxville: University of Tennessee, 2002.

LEITE, Suzany A. *et al.* Area-Wide Survey of Chlorantraniliprole Resistance and Control Failure Likelihood of the Neotropical Coffee Leaf Miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Journal of economic entomology**, v. 113, n. 3, p. 1399–1410, 6 jun. 2020. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa017>

LI, Yan *et al.* The Effect of Different Dietary Sugars on the Development and Fecundity of *Harmonia axyridis*. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 574851, 15 set. 2020. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.574851>

LIMA, Valesca Henrique *et al.* Complex nitrogen sources from agro-industrial byproducts: impact on production, multi-stress tolerance, virulence, and quality of Beauveria bassiana blastospores . **Microbiology Spectrum**, v. 12, n. 6, 4 jun. 2024. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04040-23>

LOPEZ, Diana Castillo; SWORD, Gregory A. The endophytic fungal entomopathogens Beauveria bassiana and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). **Biological Control**, v. 89, p. 53–60, 1 out. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.03.010>

LÓPEZ-BUCIO, José *et al.* Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. **Plant Science**, v. 160, n. 1, p. 1–13, 7 dez. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00347-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00347-2)

LUANGSA-ARD, J. Jennifer *et al.* On the relationships of Paecilomyces sect. Isarioidea species. **Mycological research**, v. 109, n. Pt 5, p. 581–589, 2005. <https://doi.org/10.1017/S0953756205002741>

MAGALHÃES, S. T. V. *et al.* Effect of coffee alkaloids and phenolics on egg-laying by the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella*. **Bulletin of entomological research**, v. 98, n. 5, p. 483–489, out. 2008a. <https://doi.org/10.1017/S0007485308005804>

MAGALHÃES, S. T. V. *et al.* Leaf alkaloids, phenolics, and coffee resistance to the leaf miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 4, p. 1438–1443, 2010. <https://doi.org/10.1603/EC09362>

MAGALHÃES, Sérgio Tinôco V. *et al.* Coffee leaf volatiles and egg laying by the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella*. **Crop Protection**, v. 27, n. 6, p. 1038–1041, 2008b. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.12.005>

MARCELINO, Jose *et al.* *Colletotrichum acutatum* var. *fioriniae* (teleomorph: *Glomerella acutata* var. *fioriniae* var. nov.) infection of a scale insect. **Mycologia**, v. 100, n. 3, p. 353–374, maio 2008. <https://doi.org/10.3852/07-174R>

MARCELINO, José A. P. *et al.* Entomopathogenic activity of a variety of the fungus, *Colletotrichum acutatum*, recovered from the elongate hemlock scale, *Fiorinia externa*. **Journal of insect science (Online)**, v. 9, 4 fev. 2009. <https://doi.org/10.1673/031.009.1301>

MATIELLO, J. B. *et al.* **Siriema AS1**. Disponível em: <<http://www.consorciopesquisacafe.com.br/index.php/2016-05-27-17-05-35/777-siriema-as1#:~:text=A Cultivar Siriema AS1 vem,entre coffeea racemosa e c.>>.

MATIELLO, J. B. *et al.* **Siriema VC 4, cultivar clonal de cafeeiros com resistência múltipla, à ferrugem e ao bicho mineiro**. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1041063/1/SiriemaVC4cultivar.pdf>>. Acesso em: 14 abr. 2025.

MCINTYRE, John L.; TAYLOR, G. S. Race 3 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. **Phytopathology**, v. 68, p. 35–38, 1978. <https://doi.org/10.1094/Phyto-68-35>

MEDINA FILHO, HP.; CARVALHO, A.; DM., Medina. Germoplasma de *Coffea racemosa* e seu potencial de melhoramento do cafeiro. **Bragantia**, v. 36, n. 4, p. 43–46, 1977. <https://doi.org/10.1590/S0006-87051977000100040>

MEJÃA, Luis C. *et al.* Pervasive effects of a dominant foliar endophytic fungus on host genetic and phenotypic expression in a tropical tree. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 12 set. 2014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00479>

MELO, T. L. *et al.* Management o coffee lea miner: spray volume, efficacy o cartap hydrochlo ride and impact on parasitism. **Coffee Science**, v. 14, n. 2, p. 250–260, 2019. <https://doi.org/10.25186/cs.v14i2.1582>

MEYLING, Nicolai V.; EILENBERG, Jørgen. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. **Biological Control**, v. 43, n. 2, p. 145–155, nov. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.07.007>

MOGHADDAM, Mohammad Reza Bolouri; VAN DEN ENDE, Wim. Sugars and plant innate immunity. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 11, p. 3989–3998, jun. 2012. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers129>

MOKA, Suma; SINGH, Narinder; BUTTAR, Daljeet Singh. Identification of potential native chitinase-producing *Trichoderma* spp. and its efficacy against damping-off in onion. **European Journal of Plant Pathology**, v. 161, n. 2, p. 289–300, 1 out. 2021. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02321-9>

MOURA, Sarah Conessa de *et al.* Xilanases microbianas e suas aplicações industriais. **Documentos / Embrapa Agroenergia**, n. 38, p. 53, 2021.

NANTES, J. F. D.; PARRA, J. R. P. Biologia de *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidoptera, Lyonetiidae), em três variedades de café (*Coffea* spp). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 6, n. 2, p. 156–163, 1 dez. 1977. <https://doi.org/10.37486/0301-8059.v6i2.109>

NATHANSON, J. A. Caffeine and Related Methylxanthines: Possible Naturally Occurring Pesticides. **Science**, v. 226, n. 4671, p. 184–187, 12 out. 1984. <https://doi.org/10.1126/science.6207592>

NEWFELD, Jacy; UJIMATSU, Ren; HIRUMA, Kei. Uncovering the Host Range–Lifestyle Relationship in the Endophytic and Anthracnose Pathogenic Genus *Colletotrichum*. **Microorganisms**, v. 13, n. 2, p. 428, 1 fev. 2025. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13020428>

OH, Seon Woo *et al.* Approach strategies and application of metabolomics to biotechnology in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1192235, 11 ago. 2023. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1192235>

OLIVEIRA, RJV *et al.* Endophytic fungal diversity in coffee leaves (*Coffea arabica*) cultivated using organic and conventional crop management systems. **Mycosphere**, v. 5, n. 4, p. 523–530, 2014. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/5/4/4>

ORTIZ-URQUIZA, Almudena; KEYHANI, Nemat O. Action on the Surface: Entomopathogenic Fungi versus the Insect Cuticle. **Insects**, v. 4, n. 3, p. 357–374, set. 2013. <https://doi.org/10.3390/insects4030357>

OWNLEY, Bonnie H. *et al.* Beauveria bassiana, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pests and plant pathogens. In: **Lartey RT, Caesar A (eds) Emerging Concepts in Plant Health Management. Research Signpost, Kerala**, n. August 2016, p. 255–269, 2004.

PAINTER, REGINALD H. Insect Resistance in Crop Plants. **Soil Science**, v. 72, n. 6, p. 481, dez. 1951. <https://doi.org/10.1097/00010694-195112000-00015>

PANCHAL, Poonam; MILLER, Anthony J.; GIRI, Jitender. Organic acids: Versatile stress-response roles in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 11, p. 4038–4052, 18 maio 2021. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab019>

PARSA, Soroush *et al.* Root environment is a key determinant of fungal entomopathogen endophytism following seed treatment in the common bean, Phaseolus vulgaris. **Biological Control**, v. 116, p. 74–81, 1 jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.09.001>

PENG, Li-Juan *et al.* Colletotrichum species on grape in Guizhou and Yunnan provinces, China. **Mycoscience**, v. 54, n. 1, p. 29–41, jan. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2012.07.006>

PERROIS, Charlène *et al.* Differential regulation of caffeine metabolism in Coffea arabica (Arabica) and Coffea canephora (Robusta). **Planta**, v. 241, n. 1, p. 179, 1 jan. 2014. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2170-7>

PETERSON, S. W. *et al.* Penicillium coffeae, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to P. fellutanum, P. thiersii and P. brocae based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. **Mycologia**, v. 97, n. 3, p. 659–666, 1 maio 2005. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832796>

PHOTITA, Wipornpan *et al.* Morphological and molecular characterization of Colletotrichum species from herbaceous plants in Thailand. **Fungal Diversity**, n. 18, p. : 117-133, 2005.

POLTRONIERI, Palmiro.; BURBULIS, Natalija.; FOGHER, Corrado. **From plant genomics to plant biotechnology**. Oxford: Woodhead Publishing, 2013.  
<https://doi.org/10.1533/9781908818478>

POSADA, Francisco *et al.* Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen Beauveria bassiana (Ascomycota: Hypocreales). **Mycological Research**, v. 111, n. 6, p. 748–757, jun. 2007.  
<https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.006>

POTRICH, T.D.; LORINI, I. ;; VOSS, M.; STEFFENS, M. C. S.; PAVANI, D. P. METODOLOGIA DE CRIAÇÃO DE *Tenebrio molitor* EM LABORATÓRIO PARA OBTENÇÃO DE LARVAS. **Documentos/ Embrapa**, n. 82, 2007.

QASIM, Muhammad *et al.* Impact of plant monoterpenes on insect pest management and insect-associated microbes. **Heliyon**, v. 10, n. 20, p. e39120, 30 out. 2024.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e39120>

QAYYUM, Mirza Abdul *et al.* Infection of *Helicoverpa armigera* by endophytic Beauveria bassiana colonizing tomato plants. **Biological Control**, v. 90, p. 200–207, 1 nov. 2015.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.005>

QUESADA-MORAGA, E. *et al.* Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic Beauveria bassiana strain. **Mycopathologia**, v. 161, n. 5, p. 323–329, maio 2006. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0014-0>

QUESADA-MORAGA, E.; MUÑOZ-LEDESMA, F. J.; SANTIAGO-ALVAREZ, C. Systemic protection of *Papaver somniferum* L. against *Iraella luteipes* (Hymenoptera: Cynipidae) by an endophytic strain of Beauveria bassiana (Ascomycota: Hypocreales). **Environmental entomology**, v. 38, n. 3, p. 723–730, jun. 2009. <https://doi.org/10.1603/022.038.0324>

RABIN, L. B.; PACOVSKY, R. S. Reduced larva growth of two Lepidoptera (Noctuidae) on excised leaves of bean infected with a mycorrhizal fungus. **Journal of Economic Entomology**, v. 78, p. 1358–1363, 1985. <https://doi.org/10.1093/jee/78.6.1358>

RAMÍREZ ORDUÑA, Rafael; GONZALO RAMÍREZ LOZANO, Roque; LÓPEZ GUTIÉRREZ, Francisco. Factores estructurales de la pared celular del forraje que afectan su digestibilidad. **Ciencia UANL**, v. 2, n. 2, p. 180–189, 2002.

RAMIRO, Daniel Alves; GUERREIRO-FILHO, Oliveiro; MAZZAFERA, Paulo. Phenol contents, oxidase activities, and the resistance of coffee to the leaf miner *Leucoptera coffeella*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 9, p. 1977–1988, 2006. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9122-z>

REIS, Paulo Rebelles; SOUZA, Júlio César de. Café: insetos na folha. **Cultivar**, 2002.

RESQUÍN-ROMERO, G. *et al.* Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 136, p. 23–31, 1 maio 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.03.003>

ROBERTS, Walden K.; SELITRENNIKOFF, Claude P. Plant and Bacterial Chitinases Differ in Antifungal Activity. **Microbiology**, v. 134, n. 1, p. 169–176, 1 jan. 1988. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-1-169>

ROLLAND, Filip; BAENA-GONZALEZ, Elena; SHEEN, Jen. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. Volume 57, 2006, p. 675–709, 2 jun. 2006. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441>

RUSSO, María L. *et al.* Endophytic colonisation of tobacco, corn, wheat and soybeans by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales). **Biocontrol Science and Technology**, v. 25, n. 4, p. 475–480, 3 abr. 2015. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.982511>

SAIKKONEN, K. *et al.* Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 319–343, 1998. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.319>

SAIKKONEN, Kari *et al.* Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends in plant science**, v. 9, n. 6, p. 275–280, 1 jun. 2004. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(04\)00102-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(04)00102-5)

SAIKKONEN, Kari *et al.* Model systems in ecology: dissecting the endophyte-grass literature. **Trends in plant science**, v. 11, n. 9, p. 428–433, set. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.07.001>

SALOJÄRVI, Jarkko *et al.* The genome and population genomics of allopolyploid Coffea arabica reveal the diversification history of modern coffee cultivars. **Nature Genetics**, v. 56, n. 4, p. 721–731, 15 abr. 2024. <https://doi.org/10.1038/s41588-024-01695-w>

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. /S.l./: Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2001.

SANTAMARÍA, Johanna; BAYMAN, Paul. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (Coffea arabica). **Microbial ecology**, v. 50, n. 1, p. 1–8, jul. 2005. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0002-1>

SANTOS JÚNIOR, Helvécio M. *et al.* URSOLIC ACID AND CIS-TILIROSIDE PRODUCED BY Merremia tomentosa AFFECT OVIPOSITION OF Leucoptera coffeella ON COFFEE PLANTS. **Quim. Nova**, v. 41, n. 3, p. 302–309, 2018. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170185>

SCHARDL, Christopher L.; LEUCHTMANN, Adrian; SPIERING, Martin J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annual review of plant biology**, v. 55, p. 315–340, 2004. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141735>

SCHULZ, Barbara *et al.* Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996–1004, 1 set. 2002. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006342>

SCHULZ, Barbara; BOYLE, Christine. The endophytic continuum. **Mycological research**, v. 109, n. Pt 6, p. 661–686, 2005. <https://doi.org/10.1017/S095375620500273X>

SEIDL, Verena. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 36–42, 1 fev. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2008.03.002>

SEYDEL, Peter *et al.* Formation of cyclotides and variations in cyclotide expression in Oldenlandia affinis suspension cultures. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 77, n. 2, p. 275–284, nov. 2007. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1159-6>

SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 61, n. 5–6, p. 413–423, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1240-8>

SHARMA, Amrit; SHARMA, Shaurav; YADAV, Pankaj Kumar. Entomopathogenic fungi and their relevance in sustainable agriculture: A review. **Cogent Food and Agriculture**, v. 9, n. 1, 2023. <https://doi.org/10.1080/23311932.2023.2180857>

SIEBER, Thomas N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2–3, p. 75–89, 1 maio 2007. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.004>

SILVA, Flávia Augusta Cloplet da; PANIZZI, Antônio Ricardo. Interações Inseto-Planta. In: BALDIN, Edson Luiz Lopes; VENDRAMIN, José Djair; LOURENÇÂO, André Luiz (Orgs.). **Resistência de Plantas a Insetos: Fundamentos e Aplicações**. Campinas - São Paulo: FEALQ, 2019. p. 65–98.

SMITH, C. Michael. **Plant Resistance to Arthropods**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2005. <https://doi.org/10.1007/1-4020-3702-3>

SMITH, J. E.; KORSTEN, L.; AVELING, T. A. S. Infection process of *Colletotrichum dematium* on cowpea stems. **Mycological Research**, v. 103, n. 2, p. 230–234, 1999. <https://doi.org/10.1017/S0953756298006868>

SMITH, K. T. Reciprocal Translocation of Carbohydrates Between Host and Fungus in Bahiagrass Infected with *Myriogenospora atramentosa*. **Phytopathology**, v. 75, n. 4, p. 407, 1985. <https://doi.org/10.1094/Phyto-75-407>

SOUSA, Leandro Pio De; FILHO, Oliveiro Guerreiro; MONDEGO, Jorge Maurício Costa. Differences between the Leaf Mycobiome of *Coffea arabica* and Wild Coffee Species and Their Modulation by Caffeine / Chlorogenic Acid Content. **Microorganisms**, v. 9, n. 11, 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112296>

SOUZA, Júlio César de; REIS, Paulo Rebelles; RIGITANO, Renê Luis de Oliveira. Bicho mineiro do cafeiro: biologia, danos e manejo integrado. **Boletim Técnico EPAMIG**, v. 54, p. 50, 1998.

STONE, JK.; BACON, CW.; WHITE, JF. An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined. **Microbial Endophytes**, p. 3–33, 9 jul. 2020.

STRAUSS, Sharon Y.; AGRAWAL, Anurag A. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, n. 5, p. 179–185, 1 maio 1999. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01576-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01576-6)

SUNG, Gi Ho *et al.* Phylogenetic classification of Cordyceps and the clavicipitaceous fungi. **Studies in mycology**, v. 57, p. 5–59, 2007. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.57.01>

SURYANARAYANAN, Trichur S. Endophyte research: going beyond isolation and metabolite documentation. **Fungal Ecology**, v. 6, n. 6, p. 561–568, 1 dez. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.09.007>

TEFERA, Tadele; VIDAL, Stefan. Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana. **BioControl**, v. 54, n. 5, p. 663–669, 24 set. 2009. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9216-y>

THIRUNAVUKKARASU, N. *et al.* A rapid and simple method for screening fungi for extracellular protease enzymes. **Mycosphere**, v. 8, n. 1, 2017. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/8/1/12>

TRIVEDI, Pankaj *et al.* Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. **Nature Reviews Microbiology** 2020 18:11, v. 18, n. 11, p. 607–621, 12 ago. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>

VALADARES-INGLIS, Maria Cleria; LOPES, Rogerio Biaggioni; FARIA, Marcos Rodrigues de. Controle de artrópodes-praga com fungos entomopatogênicos. In: FONTES, Eliana Maria Gouveia; VALADARES-INGLIS, Maria Cleria (Orgs.). **Controle biológico de pragas da agricultura**. 1. ed. Brasília, DF: EMBRAPA, 2020. p. 510.

VAN DER HEIJDEN, Marcel G. A.; HARTMANN, Martin. Networking in the Plant Microbiome. **PLoS biology**, v. 14, n. 2, 12 fev. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002378>

VEGA, Fernando E. *et al.* Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control**, v. 46, n. 1, p. 72–82, jul. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bioco.2008.01.008>

VEGA, Fernando E. Insect pathology and fungal endophytes. **Journal of invertebrate pathology**, v. 98, n. 3, p. 277–279, jul. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.008>

VEGA, Fernando E. *et al.* Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v. 2, n. 4, p. 149–159, nov. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.05.001>

VEGA, Fernando E. *et al.* Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. **Fungal Ecology**, v. 3, n. 3, p. 122–138, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.07.002>

VILLACORTA, Amador. Ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* isolate CM-14 on the coffee leaf miner *Perileucoptera coffeella* [Lep: Lyonetiidae]. **Entomophaga**, v. 28, n. 2, p. 179–184, 1983. <https://doi.org/10.1007/BF02372142>

WANCHOO, Arun; LEWIS, Michael W.; KEYHANI, Nemat O. Lectin mapping reveals stage-specific display of surface carbohydrates in in vitro and haemolymph-derived cells of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Microbiology**, v. 155, n. 9, p. 3121–3133, 2009. <https://doi.org/10.1099/mic.0.029157-0>

WANG, Haiyang *et al.* The Toxins of *Beauveria bassiana* and the Strategies to Improve Their Virulence to Insects. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 705343, 26 ago. 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705343>

WEBBER, Joan. A natural biological control of Dutch elm disease. **Nature**, v. 292, n. 5822, p. 449–451, jul. 1981. <https://doi.org/10.1038/292449a0>

WEI, Yangdou *et al.* Targeted gene disruption of glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Colletotrichum gloeosporioides* reveals evidence that glycerol is a significant transferred nutrient

from host plant to fungal pathogen. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 1, p. 429–435, 2 jan. 2004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308363200>

WENG, Jing Ke *et al.* Adaptive mechanisms of plant specialized metabolism connecting chemistry to function. **Nature chemical biology**, v. 17, n. 10, p. 1037–1045, 1 out. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00822-6>

WHITE, Ian R.; BACKHOUSE, David. Comparison of fungal endophyte communities in the invasive panicoid grass Hyparrhenia hirta and the native grass Bothriochloa macra. **Australian Journal of Botany**, v. 55, n. 2, p. 178–185, 2007. <https://doi.org/10.1071/BT06125>

WHITE, T. J. *et al.* AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. **PCR Protocols**, p. 315–322, 1990. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>

WYNNS, Anja Amtoft *et al.* Colletotrichum nymphaeae var. entomophilum var. nov. a natural enemy of the citrus scale insect, Praelongorthezia praelonga (Hemiptera: Ortheziidae). **Scientia Agricola**, v. 77, n. 5, p. 2020, 2020. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2018-0269>

YANG, Ai-Ling *et al.* Disease risk of the foliar endophyte Colletotrichum from invasive Ageratina adenophora to native plants and crops. **Fungal Ecology**, v. 72, p. 101386, dez. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2024.101386>

ZIBAEE, Arash; SADEGHI-SEFIDMAZGI, Ali; FAZELI-DINAN, Mahmoud. Properties of a lipase produced by Beauveria bassiana: purification and biochemical studies. **Biocontrol Science and Technology**, v. 21, n. 3, p. 317–331, mar. 2011. <https://doi.org/10.1080/09583157.2010.548595>