UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

FCA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
UNESP | BOTUCATU

THIAGO SOUZA BULHÕES

PRODUÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM MEIOS SÓLIDO E LÍQUIDO E PATOGENICIDADE À *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)

Botucatu

2024

THIAGO SOUZA BULHÕES

PRODUÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM MEIOS SÓLIDO E LÍQUIDO E PATOGENICIDADE À *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientador: Carlos Frederico Wilcken

Coorientador(a): Gabriel Moura Mascarin

Botucatu

2024

B933p

Bulhões, Thiago Souza

Produção de fungos entomopatogênicos em meios sólido e líquido e patogenicidade à Spodoptera frugipera (Lepidoptera: Noctuidae) e Thaumastocoris peregrinus (Hemiptera: Thaumastocoridae) / Thiago Souza Bulhões. -- , 2026

64 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu,

Orientador: Carlos Frederico Wilcken

Coorientador: Gabriel Moura Mascarin

1. Agentes biológicos no controle de pragas. 2. Fungos Cultura e meios de cultura. 3. Agricultural pests Biological control. 4. Pragas florestais. I. Título.

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PRODUÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM MEIOS SÓLIDO E LÍQUIDO E PATOGENICIDADE A *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)

AUTOR: THIAGO SOUZA BULHÕES
ORIENTADOR: CARLOS FREDERICO WILCKEN
COORIENTADOR: GABRIEL MOURA MASCARIN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CARLOS FREDERICO WILCKEN (Participação Virtual)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP

Pesquisador Dr. MURILO FONSECA RIBEIRO (Participação Virtual)
PROTEF /IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais)

Pesquisadora Dr.ª SIMONE GRAZIELE MOIO VELOZO (Participação Virtual)
. / UPL Brasil

Botucatu, 28 de março de 2024.

Aos meus pais e minha irmã,

Gervasio, Julia e Thaís,

dedico

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista (FCA/UNESP) em especial o Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Proteção de Plantas) e todos seus professores pelos ensinamentos e infraestrutura.

À minha família e amigos pelo apoio, refúgio e cuidado em todos os momentos em que eu necessitava.

Ao meu professor e orientador Dr. Carlos Frederico Wilcken, pela oportunidade que me foi dada, os ensinamentos, direcionamentos, paciência e dedicação.

Ao meu coorientador Dr. Gabriel Moura Mascarin, pela disponibilidade, aprendizado e parceria.

Aos integrantes do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais pela companhia no dia a dia e troca de conhecimentos em especial a equipe de microbiologia Bruno, Bianca, Paula e Pedro.

Ao professor Dr. Edson Luiz Furtado e sua equipe, em especial o Lucas e Lisandro pelo troca de equipamentos e matérias para a realização de experimentos.

A professora Dra. Regiane Cristina de Oliveira e a equipe do AGRIMIP pelo suporte com a criação da *Spodoptera frugiperda.*

A professora Dra. Silvia Renata Siciliano Wilcken e equipe, em especial Matheus e Jessica pela ajuda com materiais e bate-papos.

A professora Dra. Maria Márcia Pereira Sartori pelo auxílio com os tratamentos estatísticos dos dados.

A equipe do Julius Kühn Institute (JKI), principalmente ao professor Dr. Dietrich Stephan pelos ensinamentos e troca de informações.

A Koppert que cedeu os micoinseticidas utilizados.

Ao CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio para execução do projeto Bio-Entosource (Processo n° 2018/12458-5).

Ao IPEF (Instituto de Estudos e Pesquisas Florestais) e às empresas filiadas, que integram o PROTEF (Programa de Proteção Florestal) que tanto auxiliaram para o meu desenvolvimento profissional e da pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram com meu caminho desde as mais simples ações. Muito obrigado!

RESUMO

Os insetos-praga são uma das principais causas de grandes perdas na produtividade agrícola e florestal, destacando-se *Spodoptera frugiperda*, uma praga-chave para a cultura do milho, e *Thaumastocoris peregrinus*, que afeta o eucalipto. As táticas de manejo biológico, como o uso de fungos entomopatogênicos, surgem como uma alternativa viável e mais sustentável quando comparado aos manejos tradicionais de pragas. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a viabilidade da produção de fungos entomopatogênicos em diferentes condições, sua termotolerância, assim como sua eficácia no controle de *S. frugiperda* e *T. peregrinus*. No primeiro capítulo, foram avaliados métodos de produção dos fungos *Cordyceps javanica* e *Metarhizium anisopliae* em meio sólido (arroz) e líquido e de *Beauveria bassiana* em meio sólido. Em arroz, os fungos atingiram concentrações elevadas, ultrapassando a marca de $1x10^9$ conídios.g^{-1}, com destaque para *C. javanica* que atingiu a maior produção absoluta. Em meio líquido, *C. javanica* obteve concentração máxima de $1,84x10^9$ blastósporos.ml^{-1} e *M. anisopliae* de $2,08x10^8$ blastósporos.ml^{-1}. A avaliação de termotolerância revelou que os conídios aéreos são mais resistentes ao estresse térmico (45 ºC) do que os blastósporos. No segundo capítulo, *C. javanica* foi testado contra *S. frugiperda*, porém não se mostrou eficaz contra a praga. Já no terceiro capítulo, propágulos de *M. anisopliae* foram avaliados contra *T. peregrinus*, resultando em mortalidade absoluta (100%) em todos os tratamentos fúngicos após cinco dias de avaliação. Os blastósporos produzidos em meio líquido (FDL) destacaram-se pela ação mais rápida (TL_{50} de 1,81 dias), demonstrando virulência 2,5 vezes superior ao padrão comercial. Os estudos realizados fornecem novos isolados e meios líquidos viáveis para a produção em larga escala de fungos e demonstram a alta eficácia de blastósporos no controle de *T. peregrinus*.

Palavras-chave: controle biológico; blastósporos; lagarta do cartucho; percevejo bronzeado; milho; eucalipto.

ABSTRACT

Insect pests are a major cause of significant losses in agricultural and forestry productivity, notably *Spodoptera frugiperda*, a key pest for maize crops, and *Thaumastocoris peregrinus*, which affects eucalyptus. Biological management tactics, such as the use of entomopathogenic fungi, emerge as a viable and more sustainable alternative compared to traditional pest management. The objectives of this study were to evaluate the feasibility of producing entomopathogenic fungi under different conditions, their thermotolerance, as well as their efficacy in controlling *S. frugiperda* and *T. peregrinus*. In the first chapter, production methods for the fungi *Cordyceps javanica* and *Metarhizium anisopliae* in solid (rice) and liquid media, and *Beauveria bassiana* in solid medium, were evaluated. In rice, the fungi reached high concentrations, exceeding $1x10^{9}$ conidia.g^{-1}, with *C. javanica* standing out for achieving the highest absolute production. In liquid media, *C. javanica* reached a maximum concentration of $1.84x10^{9}$ blastospores.ml^{-1}, and *M. anisopliae* reached $2.08x10^{8}$ blastospores.ml^{-1}. The thermotolerance evaluation revealed that aerial conidia are more resistant to heat stress (45 °C) than blastospores. In the second chapter, *C. javanica* was tested against *S. frugiperda*, but it did not prove effective against the pest. In the third chapter, *M. anisopliae* propagules were evaluated against *T. peregrinus*, resulting in absolute mortality (100%) across all fungal treatments after five days of evaluation. Blastospores produced in liquid medium (FDL) stood out for their faster action (LT_{50} of 1.81 days), demonstrating a virulence 2.5 times higher than the commercial standard. The conducted studies provide new isolates and viable liquid media for the large-scale production of fungi and demonstrate the high efficacy of blastospores in controlling *T. peregrinus*.

Keywords: biological control; blastospores; fall armyworm; bronze bug; corn; eucalyptus.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL 15

CAPÍTULO 1 – PRODUÇÃO E TERMOTOLERÂNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM ESTADO SÓLIDO E LÍQUIDO 18

1.1 INTRODUÇÃO 18

1.2 MATERIAL E MÉTODOS 19

1.2.1 Fungos entomopatogênicos (FEP) 19

1.2.2 Viabilidade dos fungos 19

1.2.3 Reativação e preparo do inóculo 20

1.2.4 Produção dos fungos em fase sólida 20

1.2.5 Produção de *Cordyceps javanica* em fase líquida 21

1.2.6 Produção de *Metarhizium anisopliae* em fase líquida 22

1.2.7 Termotolerância de conídios aéreos e blastósporos 22

1.2.8 Delineamento experimental e análise estatística 23

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 23

1.3.1 Produção de fungos entomopatogênicos em arroz 23

1.3.2 Produção de fungos entomopatogênicos em meio líquido 24

1.3.3 Tolerância de fungos entomopatogênicos a altas temperaturas 28

1.4 CONCLUSÕES 30

REFERÊNCIAS 32

CAPÍTULO 2 – PATOGENICIDADE DE *Cordyceps javanica* A LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) 34

2.1 INTRODUÇÃO 34

2.2 MATERIAL E MÉTODOS 36

2.2.1 Fungos entomopatogênicos (FEP) 36

2.2.2 Criação de *Spodoptera frugiperda* 36

2.2.3 Viabilidade dos fungos 37

2.2.4 Reativação e preparo do inóculo 38

2.2.5 Screening de isolados de fungos entomopatogênicos em *Spodoptera frugiperda* 39

2.2.6 Patogenicidade de *Cordyceps javanica* a *Spodoptera frugiperda* 40

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 41
2.4 CONCLUSÕES 44
REFERÊNCIAS 45
CAPÍTULO 3 – USO DE PROPÁGULOS DE *Metarhizium anisopliae* NO CONTROLE DE *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE) 47
3.1 INTRODUÇÃO 47
3.2 MATERIAL E MÉTODOS 48
3.2.1 Fungos entomopatogênicos (FEP) 48
3.2.2 Criação do percevejo 49
3.2.3 Viabilidade dos fungos 49
3.2.4 Obtenção do inóculo em fase sólida 50
3.2.5 Obtenção do inóculo em fase líquida 50
3.2.6 Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* a *Thaumastocoris peregrinus* ... 50
3.2.7 Delineamento experimental e análise estatística 52
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 53
3.4 CONCLUSÕES 57
REFERÊNCIAS 58
CONSIDERAÇÕES FINAIS 60
REFERÊNCIAS 62

INTRODUÇÃO GERAL

Um dos grandes inimigos das plantações de forma geral são os insetos-pragas tanto no setor florestal como agrícola.

As florestas plantadas fornecem benefícios econômicos, sociais e ambientais, desempenhando papel fundamental no fornecimento de madeira e diversos produtos secundários. Representam 1,3% do PIB nacional chegando a uma receita bruta total de R$ 260,0 bilhões em 2022. As florestas ainda contribuem para a proteção de bacias hidrográficas, na conservação da biodiversidade, no controle de erosão e na qualidade do solo. (Kenis, 2019; IBÁ, 2024).

Já o setor agrícola, segundo o centro de estudos avançados em economia aplicada (CEPEA), teve no 2º trimestre de 2021 participação no mercado de trabalho brasileiro de 20,55%, o que caracteriza em 18,04 milhões de pessoas empregadas direta ou indiretamente (Barros *et al.*, 2021). Em 2019, representou 43,2% das exportações totais do país (Brasil, 2020), sendo o milho, uma cultura de importância agrícola, exportado cerca de 29,5 milhões de toneladas entre 2020 e 2021 com projeção de passar de 40 milhões até 2031 (Brasil, 2021).

Os insetos-praga ocasionam riscos a essas duas grandes culturas acarretando grandes perdas de produção caso não controlados, assim como em perdas ecológicas e sociais. Dentre eles, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), popularmente conhecida como lagarta-do-cartucho tem grande destaque no setor agrícola, principalmente na cultura do milho como praga-chave (Cruz, 1995). Já no setor florestal, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), popularmente conhecido como percevejo bronzeado, é uma das principais pragas que ocorrem no eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (Wilcken *et al.*, 2015).

Spodoptera frugiperda, inseto nativo de regiões tropicais e subtropicais das Américas, foi detectada na África a partir de 2016, na Índia em 2018 e na Ásia em geral em 2019. Nos últimos anos, sua incidência tem crescido significativamente, tornando-se um problema global (FAO, 2019).

Ela é uma praga polífaga que no estágio larval pode se alimentar de mais de 350 espécies diferentes de cultivos, como arroz, batata, algodão, tomate, sorgo entre outras, tendo maior dano registrado em gramíneas cultivadas, principalmente em milho (Russo *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2021).

T. peregrinus, por sua vez, é um inseto hemimetábolo e de hábito fitófago. É uma praga florestal de origem australiana que causa grande dano as árvores de eucalipto, com desfolhamento severo, e que já foi amplamente disseminado pelo mundo, havendo registros em países como África do Sul, Argentina, Uruguai, Chile, entre outros (Carpintero; Dellapé, 2006; Barbosa *et al.*, 2012; Wilcken *et al.*, 2015)).

O controle biológico para o percevejo bronzeado se destaca por seu potencial, uma vez que reduz o uso de químicos ao mesmo tempo em que possui diferenciais, como especificidade à praga-alvo, mínimo risco à biodiversidade e ao desenvolvimento de resistência pelas pragas (Lacey; Kaya, 2007; Mantzoukas; Eliopoulos, 2020).

O desenvolvimento sustentável ganhou foco a partir da conferência das Nações Unidas para o meio ambiente e desenvolvimento (CNUMAD) que foi realizado em 1992 no Rio de Janeiro. Com o surgimento desse conceito e o destaque dos impactos negativos do modelo agropecuário tradicional, se tornou necessário o desenvolvimento de novas tecnologia voltadas para uma agricultura sustentável, na qual o controle biológico se encaixa, de forma a reduzir a necessidade exclusiva de substâncias menos sustentáveis.

Em 2023 o mercado mundial de biopesticidas teve alto valor agregado estimado de 6 a 8 bilhões de dólares, com registro de mais de 600 produtos biológicos no Brasil, sem contar que foi relatado que uso dos biológicos associado aos inseticidas químicos elevou a efetividade do controle de pragas de 50% para acima de 90%. Além disso a substituição dos químicos pelo biológicos pode ter como consequência a redução entre 60 a 90% por hectare/ano de gases do efeito estufa (Croplife, 2023).

No Brasil, diante do que dispõe a Lei de Propriedade Industrial (Lei 9.279/1996), fica estabelecido que a comercialização de microrganismos como produto depende do seu depósito em banco de cepas, tendo em vista a obrigatoriedade da reprodutibilidade de qualquer processo patenteável.

A determinação legal influenciou o mercado de biológicos brasileiro de tal forma que os isolados presentes na maioria dos produtos biológicos são os mesmos, diante da maior facilidade em desenvolver um produto com uma cepa já depositada, que passou por todos os trâmites legais para liberação ao uso do que registrar uma nova, cujo processo demanda tempo e dinheiro (Junqueira, 2019).

A busca por novos isolados, no entanto, não deve ser negligenciada. Em verdade, sabe-se que diferentes cepas de um mesmo organismo podem apresentar diferentes propriedades, como uma maior produção de propágulo ou maior resistência a fatores abióticos, por exemplo, com a alteração do fenótipo pela influência ambiental, a evidenciar a importância de pesquisas como esta.

Nesse contexto, dentro do controle biológico, uma das principais ferramentas é o uso de fungos entomopatogênicos como agente de controle. O objetivo dessa dissertação foi avaliar a eficácia da produção de novas linhagens de fungos entomopatogênicos, pertencentes à coleção do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF), tanto em fase sólida, como em fase líquida ao mesmo tempo que foi dimensionado a estabilidade e a viabilidade do uso desses fungos de forma a desenvolver mais uma alternativa de controle biológico tendo como alvos *Spodoptera frugiperda* e *Thaumastocoris peregrinus.*

CAPÍTULO 1
PRODUÇÃO E TERMOTOLERÂNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM ESTADO SÓLIDO E LÍQUIDO

Thiago Souza Bulhões[1]; Bianca Cristina Costa Gêa[1]; Bruno Felipe Prado de Melo[1]; Paula Leite dos Santos[1]; Maria Márcia Pereira Sartori[2]; Gabriel Moura Mascarin[3]; Carlos Frederico Wilcken[1].

[1]Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais, Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de ciências Agronômicas, FCA/UNESP – Campus de Botucatu, 18610-034, Botucatu, SP, Brasil.

[2]Departamento de Fitotecnia, Faculdade de ciências Agronômicas, FCA/UNESP – Campus de Botucatu, 18610-034, Botucatu, SP, Brasil.

[3]Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP-340, km 127.5, S/N - Tanquinho Velho, 13918-110 Jaguariúna, SP, Brasil.

1.1 INTRODUÇÃO

A primeira ocorrência registrada de um inseto infectado por um fungo ocorreu em 1726. No Brasil, há mais de sessenta anos os fungos são estudados, com um crescimento expressivo de seu uso após 1964 e que vem se consolidando firmemente no mercado mundial nos últimos anos (Almeida; Batista Filho; Leite, 2019).

Os fungos possuem diferentes estruturas (propágulos) que podem ser utilizadas no controle de pragas, como conídios, micélio, blastósporos, esporos de resistência e variações desses (Faria; Wraight, 2007). A escolha do propágulo é dependente do isolado utilizado, da praga-alvo, assim como o ambiente onde vai ser aplicado e o método de aplicação (Almeida; Batista Filho; Leite, 2019; Almeida, 2020).

Nesse contexto, os conídios podem ser produzidos em fase sólida, líquida ou semilíquida, enquanto outros propágulos são obtidos em meio líquido. A composição do substrato afeta diretamente a qualidade da produção, interferindo na estabilidade, virulência, patogenicidade, no formato e na quantidade do propágulo. Quando se trata de cultivo submerso, a fonte de nitrogênio e carboidrato e a proporção entre as duas geralmente influenciam no propágulo produzido. A verificação e padronização desses

meios é uma etapa essencial para a continuidade da evolução desse tipo de produção (Almeida; Batista Filho; Leite, 2019; Almeida, 2020).

O presente estudo teve o objetivo de avaliar e desenvolver a produção em fase sólida e líquida de 3 cepas pertencentes a coleção do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF), sendo elas, *Cordyceps javanica* (LCBPF 11), *Metarhizium anisopliae* (LCBPF 31) e *Beauveria bassiana* (LCBPF 46).

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Fungos entomopatogênicos (FEP)

Os fungos entomopatogênicos utilizados são pertencentes à coleção de FEP do LCBPF, preservados pelo método de Castellani e em glicerina a 10% (-20 °C) (Tabela 1).

Tabela 1 – Cepas de fungos entomopatogênicos pertencentes a coleção do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF), FCA/UNESP – Campus de Botucatu

Isolado	Espécie	Hospedeiro	Cultura de origem	Origem geográfica
LCBPF 11	*Cordyceps javanica*	*Bemisia tabaci*	Soja	Botucatu, SP
LCBPF 31	*Metarhizium anisopliae*	*Tenebrio molitor*	Soja	Botucatu, SP
LCBPF 46	*Beauveria bassiana*	*Tenebrio molitor*	Mata nativa	Botucatu, SP

Esses isolados foram escolhidos por apresentarem altas taxas de mortalidade e baixo TL_{50} para as pragas *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) (*C. javanica* e *B. bassiana*) e *B. tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (*C. javanica*. *B. bassiana* e *M. anisopliae*) (Domingues *et al.* 2022; Gêa 2022).

1.2.2 Viabilidade dos fungos

Todos os fungos tiveram a viabilidade avaliada antes dos ensaios.A viabilidade foi determinada depositando uma alíquota 100 µl da suspensão de conídios na concentração de $1x10^6$ conídios ml^{-1}, preparada com Tween 80 (0,01% v/v), em placas de Petri (90 mm), contendo 15 ml de meio de cultura BDA suplementado com antibiótico sulfato de estreptomicina (0,01 $g.L^{-1}$), e incubadas em BOD (25 ± 1 °C e fotofase de 12 h) por 18 h. O conídio foi considerado viável quando o tubo germinativo

se encontrava duas vezes maior que o diâmetro do esporo. Um total de 100 conídios por repetição foi contabilizado em microscópio óptico com amplificação de 400x, utilizando-se três repetições por isolado. Os fungos que apresentaram viabilidade acima de 90% foram utilizados no ensaio (Wraight; Inglis; Goettel, 2007).

1.2.3 Reativação e preparo do inóculo

Os fungos utilizados foram reativados em placas de Petri (90 mm), contendo meio de cultura BDA mantidas em câmara tipo BOD (25 ± 1 °C e fotofase de 12h) por 10 dias. Os conídios foram obtidos através da raspagem superficial do meio de cultura com surfactante Tween 80 (0,01% v/v). A concentração da suspensão foi ajustada com auxílio da câmara de Neubauer e microscópio óptico para $1x10^6$ conídios ml^{-1} para a produção em arroz e o teste de termotolerância. Para a produção em meio líquido foi ajustado o inóculo para $5x10^6$ conídios ml^{-1}.

1.2.4 Produção dos fungos em fase sólida

Para a produção dos fungos em fase sólida, foi utilizado o arroz parboilizado como substrato.

O arroz foi colocado de molho em água destilada até adquirir 60% de umidade e foi transferido a Erlenmeyers de 250 ml e então autoclavado a 121 ºC e 1 atm por 30 min. Após a autoclavagem e esfriamento, os Erlenmeyers contendo o arroz foram inoculados com cada espécie individualmente em um volume de 10% do peso do arroz (p/v).

Os recipientes ficaram em sala controlada (25 ± 1 °C, UR 70 ± 4% e fotofase de 12h) por 7 dias.

Após o crescimento, 4 gramas de cada arroz acrescido do fungo foram coletados e diluídos em 40 ml de Tween 80 (0,01% v/v), para fins de contagem em câmara de Neubauer.

Cada fungo constituiu um tratamento composto por 6 repetições e foram feitos em duplicatas.

1.2.5 Produção de *Cordyceps javanica* em fase líquida

Devido ao isolado LCBF 11 (*C. javanica*) ter se sobressaído na produção em meio sólido, este foi selecionado para dar continuidade nas avaliações em meio líquido.

Para o meio líquido, foi utilizada uma matriz tendo como base o meio de cultura desenvolvido por Jackson (1997).

O experimento foi realizado em escala laboratorial, em Erlenmeyers de 250 ml em volume de 50 ml, composto por 25 ml de meio basal, 20 ml de fonte de carbono, 5 ml do inóculo e 1,25 g da fonte de nitrogênio.

A produção foi dividida em duas partes: a de pré-cultura e de cultura. A diferença entre elas foi a concentração de açúcar e do inóculo. Para a pré-cultura, foi utilizada a fonte de carbono a 20% (p/v) e o inóculo inicial foi utilizado na concentração $5x10^6$ conídios ml^{-1} provenientes das placas de BDA. Na cultura, por sua vez, a fonte de carbono foi utilizada a 35% (p/v) com inóculo inicial de $5x10^7$ blastósporos.ml-1, proveniente da pré-cultura ajustada em câmara de Neubauer.

Os Erlenmeyers foram autoclavados a 121 ºC e 1 atm por 15 minutos. Após foram inoculados e incubados em shaker (C24 Incubator Shaker©, New Brunswick Scientific®) a 250 rpm, 25 ºC e fotoperíodo 12:12 h, por três dias, sendo contabilizados a cada 24 horas, após a montagem do experimento.

Para avaliar fontes alternativas de nitrogênio e carbono, inicialmente foi feita a variação da fonte de nitrogênio tendo a dextrose como fonte de carbono fixa. Após a seleção da melhor fonte de nitrogênio, foi feita a variação da fonte de carbono, tendo como fonte de nitrogênio fixo aquele que proporcionou o melhor desenvolvimento no primeiro ensaio.

Como fontes de nitrogênio, foram utilizadas: Extrato de levedura (Dinâmica ®), Refinazil© (Ullmann®) e Hy-Soy© (Kerry®). O Refinazil é um resíduo de milho, comporto de parte fibrosa, gérmen, glúten, amido residual do processo de extração e frações proteicas solúveis. O Hy-Soy é uma fonte de peptídeos produzidos pela hidrólise enzimática da soja.

Como fontes de carbono foram utilizadas: Dextrose (Biorigin ®), Lactose (Kerry ®) e melaço de cana-de-açúcar (ICC ®).

Cada fonte de substrato teve três repetições e foram feitas em duplicata.

1.2.6 Produção de *Metarhizium anisopliae* em fase líquida

O meio de cultivo desenvolvido por Jackson (1997) não ocasionou produção ideal de *M. anisopliae* (LCBPF 31), com as fontes de nitrogênio e carbono testadas. Diante disso, foi feita adaptação do meio de cultura, utilizando-se farinha de arroz como fonte de carbono alternativa.

Foram realizados dois tratamentos seguindo o mesmo princípio de pré-cultura e cultura utilizado para o isolado LBCPF 11. Um tratamento foi denominado Farinha–Dextrose–Levedura (FDL) e o outro só com farinha de arroz (Farinha) (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição do meio de cultura utilizado no tratamento Farinha-Dextrose-Levedura (FDL) e Farinha

Ingrediente	FDL	Farinha
Meio basal	24 mL	47,75 g
Inóculo	5 mL	5 mL
Farinha de arroz	1,25 g	2,25 g
Dextrose	20 mL	-
Levedura	1,25 g	-

Os Erlenmeyers foram incubados em shaker (C24 Incubator Shaker©, New Brunswick Scientific®) a 250 rpm, 25 ºC e fotoperíodo 12:12 h, por três dias, sendo contabilizados a cada 24 horas. Cada tratamento foi constituído por três repetições e foram feitos em duplicata.

1.2.7 Termotolerância de conídios aéreos e blastósporos

Com intuito de avaliar a resistência a altas temperaturas dos isolados, conídios aéreos dos LCBPF 11, 31 e 46 foram raspados de placas de Petri (90 mm), contendo meio de cultura BDA, adicionado de Tween 80 (0,01% v/v). Para os blastósporos foi avaliado somente o isolado LCBPF 31, que foi fermentado de acordo com as informações supracitadas para o meio FDL. As amostras foram ajustadas para

concentração $1x10^6$ propágulos.ml^{-1} e foram transferidas a tubos de ensaio de vidro tampados autoclavados e colocados em banho-maria a 45 ºC.

Cada grupo foi avaliado em 5 intervalos de tempo, sendo eles: 0; 0,5; 1; 1,5 e 2 horas e para a avaliação, foi considerada a viabilidade de cada amostra por meio da análise da germinação descrita anteriormente.

Cada intervalo de tempo foi constituído por três repetições e foram feitos em duplicata.

1.2.8 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado para as análises da produção nas fases sólida e líquida. Para a fermentação em meio sólido (arroz), os dados de duas repetições independentes no tempo foram agrupados (n = 12 repetições por isolado; N = 36). Para a fase líquida, os dados de duas repetições independentes também foram agrupados (n = 6 repetições por tratamento), organizados em esquema fatorial 3 (tratamento) × 3 (dias) para *C. javanica* e 2 (tratamento) × 3 (dias) para *M. anisopliae*. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Após a confirmação da normalidade, procedeu-se à Análise de Variância (ANOVA) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para o ensaio de termotolerância, estimou-se o Tempo Letal Médio (TL_{50}) em horas a 45 ºC para cada propágulo fúngico. As porcentagens de germinação foram convertidas em proporções (limitadas entre 0,001 e 0,999 para evitar erros de separação completa) e ajustadas a um Modelo Linear Generalizado (GLM) usando uma distribuição de erro quase-binomial com uma função de ligação probit para contabilizar a sobredispersão. As curvas de sobrevivência para o estresse térmico foram plotadas utilizando a suavização de dispersão estimada localmente (LOESS).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Produção de fungos entomopatogênicos em arroz

Antes de partir para produção em escala industrial, deve-se avaliar a viabilidade de uma cepa ser produzida de forma massal. Diante disso, foi realizada a avaliação da produção dos isolados em arroz parboilizado, a partir da qual se verificou que todas as três cepas se desenvolveram eficientemente, apresentando diferenças

significativas entre si (F = 41,37; gl = 2, 33; p < 0,0001) (Figura 1 e Tabela 3). Os isolados LCBPF 31 e LCBPF 46 alcançaram altas concentrações, rendendo 1,32 ± 0,36 × 10^9 e 8,46 ± 3,61 × 10^9 conídios g^{-1}, respectivamente. Ao passo que o isolado LCBPF 11 obteve o maior rendimento, alcançando uma grandeza superior em relação às anteriores, com 11,26 ± 3,11 × 10^9 conídios g^{-1}.

Figura 1 – Fungos entomopatogênicos dos gêneros *Cordyceps, Beauveria* e *Metarhizium* produzidos em meio sólido (arroz) após o processo de peneiragem

Tabela 3 – Produção de fungos entomopatogênicos (conídio/grama) em arroz parboilizado de cada isolado testado

Isolado	Espécie	Conídio g^{-1} ± DP
LCBPF 11	*Cordyceps javanica*	1,13 ± 0,31 x10^{10}
LCBPF 31	*Metarhizium anisopliae*	1,32 ± 0,36 x10^9
LCBPF 46	*Beauveria bassiana*	8,46 ± 3,61 x10^9

Resultados similares foram obtidos em outros trabalhos. Utilizando o arroz parboilizado, Mascarin *et al.* (2013) e Rojas *et al.* (2023) obtiveram produção um pouco inferior com *C. javanica*, alcançando a concentração de 11,40x10^9 e 3,51x10^9 conídios.g^{-1}, respectivamente. Para *B. bassiana*, foi obtida a concentração 4,90x10^9

conídios.g^{-1}, usando arroz parboilizado (Mascarin *et al.*, 2013), e 2,30x10^{9} conídios.g^{-1} com arroz basmati (Taylor *et al.*, 2013). Para *M. anisopliae* o meio com arroz parboilizado, foi obtida produção acima de 1x10^{9} conídios.g^{-1} (Barra-Bucarei, Vergara, Cortes, 2016).

Oscilações da concentração de até uma casa decimal são esperadas entre fungos de mesma espécie e gênero, cuja variação está relacionada à cepa, substrato utilizado e o modo de preparo. Entretanto, são considerados produtivos aqueles que atingem no mínimo 1x10^{9} conídios.g^{-1} (Rojas *et al.*, 2023). Logo, os valores aqui obtidos pelos isolados estão dentro do esperado, podendo ser indicada a utilização dos três para uso industrial.

1.3.2 Produção de fungos entomopatogênicos em meio líquido

Os conídios aéreos possuem vantagens que os consolidam atualmente como o principal constituinte dos produtos biológicos do mercado, como o baixo custo do processo e uma maior resistência a fatores abióticos quando comparado a outros tipos de propágulos. Com a finalidade de ampliar ainda mais sua utilização e eficácia, uma das tendências é a transição da produção em meio sólido para o meio líquido, o qual possibilita maior controle dos parâmetros e produção em menor tempo (Jaronski; Mascarin, 2017; Sala *et al.*, 2019). O que inviabiliza a produção em meio líquido até então é a falta de padronização dos meios de cultura específicos, a maior susceptibilidade dos propágulos aos fatores abióticos e a falta de formulações eficientes para a defesa contra esses fatores (Sala *et al.*, 2019). O desenvolvimento de meios líquidos é um dos primeiros passos para o emprego dessa nova forma de produção.

Considerando que o isolado LCBPF 11 de *C. javanica* teve a concentração mais alta em arroz, ele foi o selecionado para dar andamento ao ensaio com o screening do meio líquido. Concomitantemente, foi realizado um ensaio com o isolado LCBPF 31 (*M. anisopliae*), empregando farinha de arroz, com intuito de aumentar a produção dessa espécie, uma vez que a mesma formulação do meio líquido utilizado para o LCBPF 11 foi pouco eficaz para essa espécie e gênero.

Para o isolado LCBPF 11 (*C. javanica*), foram selecionadas fontes alternativas de nitrogênio e carbono visando melhores rendimentos, assim como meios mais sustentáveis e econômicos, como o Refinazil®, que é um resíduo industrial do milho

e o Hy-Soy®, que são peptídeos obtidos da soja. Na avaliação das fontes de nitrogênio, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Hy-Soy®, extrato de levedura e Refinazil®) para a concentração de blastósporos no primeiro dia após a inoculação. No entanto, a partir do segundo dia, os meios de cultura contendo Refinazil® e Hy-Soy® foram significativamente superiores ao meio com levedura (F = 24,07; gl = 2, 45; p < 0,0001) por induzirem maior produção de blastósporos, não diferindo entre si. Após três dias de cultivo, as concentrações máximas atingiram 1,35±0,03×10⁹ blastósporos.ml⁻¹ com Hy-Soy® e 1,32±0,17×10⁹ blastósporos.ml⁻¹ com Refinazil® (Tabela 4).

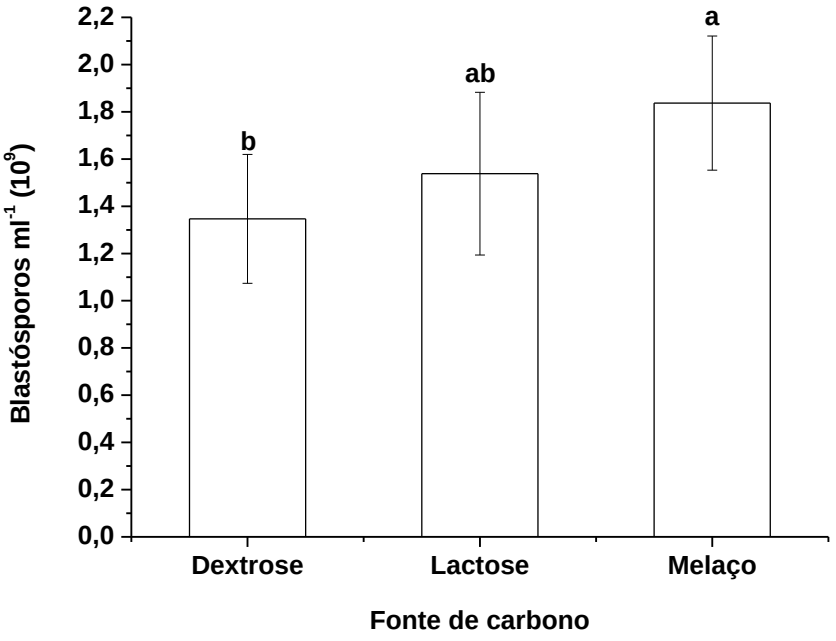
Tabela 4 – Produção de propágulos.ml^{-1} (média ± DP) de *Cordyceps javanica* (isolado LCBPF 11) produzidos em meio líquido com diferentes fontes de nitrogênio ao longo do período de avaliação (temperatura 25ºC e fotofase de 12h)

Tratamento	Tempo (dias) 1 (x10^9)	2 (x10^9)	3 (x10^9)
Hy-Soy®	0,09 ± 0,03 aC	0,76 ± 0,09 aB	1,35 ± 0,03 aA
Levedura	0,10 ± 0,05 aC	0,47 ± 0,10 bB	0,84 ± 0,21 bA
Refinazil®	0,19 ± 0,08 aC	0,79 ± 0,07 aB	1,32 ± 0,17 aA

Médias seguidas de letras iguais, minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05).

Em relação às fontes de carbono, o melaço de cana-de-açúcar superou significativamente a dextrose (F = 5,50; gl = 2, 45; p = 0,0073). Embora ambas as fontes tenham proporcionado concentrações na ordem de 10⁹ blastósporos.ml⁻¹, o melaço atingiu aproximadamente 1,8×10⁹ blastósporos.ml⁻¹, representando um aumento de quase 28% no rendimento em comparação à dextrose (1,4×10⁹ blastósporos.ml⁻¹). A lactose apresentou uma produção intermediária de blastósporos (Figura 2). De modo geral, todas as fontes testadas (com exceção do extrato de levedura) obtiveram resultados promissores, ultrapassando a marca industrial desejável de 1×10⁹ blastósporos.ml⁻¹.

Figura 2 – Concentrações de *Cordyceps javanica* (LCBPF 11) em meio líquido com diferentes fontes de carbono (temperatura 25ºC e fotofase de 12h)



Barras com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Para *M. anisopliae* (LCBPF 31), o tratamento composto somente por farinha de arroz apresentou desempenho mediano, mantendo-se abaixo de 1×10⁸ blastósporos.ml⁻¹ ao longo de todo o período. Em contrapartida, o meio FDL (Farinha–Dextrose–Levedura), devido à sua maior suplementação energética e nitrogenada, diferiu significativamente (F = 51.78; df = 1, 30; P < 0.0001), alcançando concentração superior a 2×10⁸ blastósporos ml⁻¹ no terceiro dia de fermentação (Tabela 5).

Tabela 5 – Produção de propágulos.ml^{-1} (média ± DP) de *Metarhizium anisopliae* (isolado LCBPF 31) em meio líquido (temperatura: 25ºC e fotofase de 12h)

Tratamento	Tempo (dias)		
	1	2	3
FDL (x10^8)	0,54 ± 0,54 aB	1,80 ± 0,72 aA	2,08 ± 0,96 aA
Farinha (x10^8)	0,15 ± 0,80 aA	0,19 ± 0,10 bA	0,18 ± 0,11 bA

Médias seguidas de letras iguais, minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05). FDL: Farinha – Dextrose – Levedura.

Com o uso de meio líquido semelhante ao deste trabalho, foras obtidas concentrações próximas para *C. javanica*, com valores acima de $1x10^9$ ml^{-1} (Mascarin *et al.* 2015; Corrêa *et al.* 2020. Entretanto, *M. anisopliae* parece se limitar a concentrações na casa de 10^8. mL^{-1} Em ensaio semelhante a este, foram obtidos rendimentos máximos de $3,90x10^7$ e $4,80x10^7$ blastósporos.ml^{-1} para *M. anisopliae* (Vega *et al.* 2003; Pandey, Kanaujia 2010). Em outro estudo com essa espécie, foram alcançados valores de produção de $1,58x10^8$ blastósporos.ml^{-1}, número mais próximo aos aqui obtidos (Ottati-De-Lima *et al.* 2014).

Em síntese, os protocolos desenvolvidos para *C. javanica* e *M. anisopliae* atingiram a concentração máxima de $1,84\times10^9$ e $2,08\times10^8$ blastósporos mL^{-1}, respectivamente. Tendo em vista que a produção em fase líquida se limita a concentração máxima de 1×10^9 propágulos mL^{-1}, os rendimentos do isolado LCBPF 11 e LCBPF 31 mostram-se plenamente adequados para estudos de escalonamento industrial.

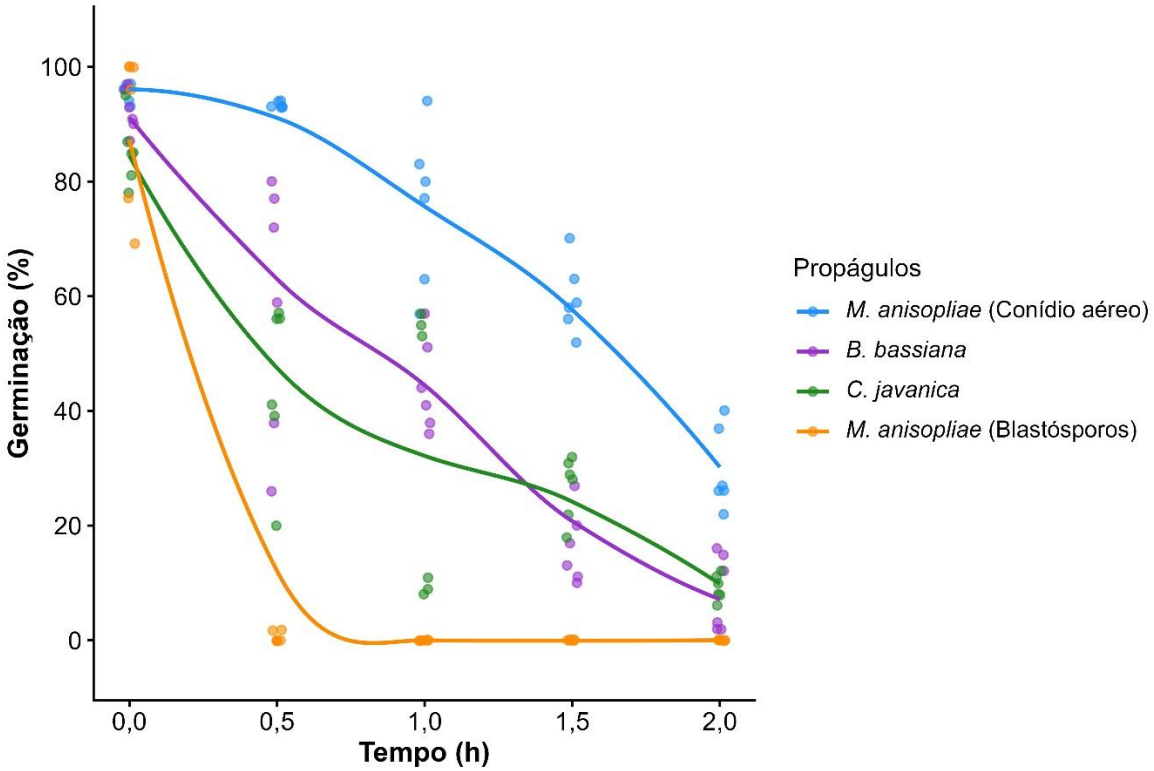
1.3.3 Tolerância de fungos entomopatogênicos a alta temperaturas

Os fungos entomopatogênicos são organismos mesófilos com temperatura ótima de crescimento entre 25 a 30 ºC, apresentando redução do seu metabolismo em temperaturas maiores que 35 ºC (Kooyman; Godonou, 1997). Os fungos utilizados neste trabalho foram isolados em trabalhos anteriores do mesmo grupo de pesquisa (Domingues *et al.*, 2022; Gêa, 2022). São fungos isolados do solo brasileiro, um país tropical, que podem ter características mais favoráveis para utilização no nosso clima, considerando que os fatores abióticos têm grande influência no sucesso do uso desses microrganismos. A avaliação da termotolerância pode evidenciar cepas menos suscetíveis a altas temperaturas, este que é um dos fatores que delimitam a ação dos fungos entomopatogênicos de forma geral no campo. A análise de sobrevivência demonstrou diferenças significativas na tolerância ao calor entre os propágulos avaliados.

De acordo com os resultados (Figura 3 e Tabela 6), o conídio aéreo do *M. anisopliae* (LCBPF 31) apresentou maior resistência a alta temperatura, com um tempo letal médio (TL_{50}) de 1,621 horas. Em seguida, observou-se a resistência dos conídios de *B. bassiana* (TL_{50} de 0,842 horas) e *C. javanica* (TL_{50} de 0,680 horas). Por

fim, o blastósporo de *M. anisopliae* foi o propágulo mais suscetível, com um TL_{50} de apenas 0,182 horas.

Figura 3 – Germinação de esporos (média) de diferentes propágulos dos diferentes isolados de fungos entomopatogênicos ao longo do tempo para avaliar a termotolerância (temperatura: 45ºC)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6 – Tempo letal médio (TL_{50}) de diferentes propágulos de isolados de fungos entomopatogênicos frente a exposição a temperatura de 45 ºC

Isolado	Propágulo	TL_{50} (h)
Beauveria bassiana	Conídio aéreo	0,842 ± 0,06
Cordyceps javanica	Conídio aéreo	0,680 ± 0,08
Metarhizium anisopliae	Conídio aéreo	1,621 ± 0,05
Metarhizium anisopliae	Blastósporo	0,182 ± ND*

*ND: Não determinado. O erro padrão (EP) não pôde ser estimado com precisão devido à separação completa dos dados (efeito Hauck-Donner) no modelo probit, causada pela perda extremamente rápida de viabilidade dos blastósporos entre os intervalos de avaliação.

Quando comparado aos conídios aéreos, os blastósporos possuem a vantagem de ter uma ação contra o inseto mais rápida, porém também tem a característica de ser mais suscetível aos fatores ambientais (Sala *et al.*, 2019). Os resultados aqui obtidos no ensaio de termotolerância confirmam essa baixa resistência às altas temperaturas.

Os conídios de *M. anisopliae* apresentaram germinação mesmo após duas horas de avaliação a 45ºC. Em contrapartida, os blastósporos da mesma cepa perderam essa resistência, chegando a reduzir 50% da sua viabilidade em aproximadamente 11 minutos de exposição a 45 ºC.

Em um trabalho semelhante, foi verificado tempo letal médio (TL_{50}) de 3,54; 2,46 e 0 dias para *B. bassiana, M. anisopliae* e *C. javanica*, respectivamente (Souza *et al.* 2014). Em comparação aos resultados de TL_{50} obtidos em nosso estudo, os isolados LCBPF 46 (*B. bassiana*) e LCBPF 31 e (*M. anisopliae*) apresentaram menor tolerância. Porém o isolado LCBPF 11 (*C. javanica*) foi mais resistente, pois o tempo letal médio foi considerado nulo, devido uma rápida queda de germinação do fungo antes de 1 horas de exposição, impossibilitando o cálculo (Souza *et al.* 2014).

Em estudo de avaliação de de cepas de *B. bassiana* e *M. anisopliae* foi observada germinação acima de 60% após 3 horas de exposição a 45 ºC (Rangel *et al.* 2023). Em contrapartida, outro estudo obteve viabilidade praticamente nula para cepas de *C. javanica* após 1 hora de exposição (Rojas *et al.* 2023). Portanto, pode-se considerar cepas de *B. bassiana e M. anisopliae* se encaixam como isolados de média tolerância a calor e *C. javanica* se destaca tendo tolerância maior que a média quando comparado a outros isolados de mesma espécie e gênero, apesar de ainda haver resultados contraditórios com esse fungo

1.4 CONCLUSÕES

Em arroz parboilizado, todos os isolados testados apresentam altas produções de propágulos, sendo adequado para a produção massal em sólido. Com relação aos meios líquidos as fontes de nitrogênio mais ricas, como o Hy-Soy® e o Refinazil®, proporcionam maior produção de propágulos que o meio com levedura.

Sobre as fontes de carbono testadas, o melaço de cana proporciona maior concentração de propágulos produzidos em comparação com o meio à base de dextrose.

Os isolados apresentaram dados medianos em relação à termotolerância, principalmente *C. javanica*, sendo os conídios aéreos mais resistentes que os blastósporos de *M. anisopliae*.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. E. M. Biofábricas para produção de micopesticidas no Brasil: oportunidades de negócio e inovações. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 3, p. 2444-2557, 2020.

ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L. G. Curso de controle microbiano de insetos – Fungos entomopatogênicos. **Instituto Biológico, São Paulo**, 2019.

BARRA-BUCAREI, L.; VERGARA, P.; CORTES, A. Conditions to optimize mass production of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 1883 in different substrates. **Chilean journal of agricultural research**, v. 76, n. 4, p. 448-454, 2016.

CORRÊA, B. *et al.* Comparative analysis of blastospore production and virulence of *Beauveria bassiana* and *Cordyceps fumosorosea* against soybean pests. **BioControl**, v. 65, n. 3, p. 323-337, 2020.

DOMINGUES, M. M. *et al.* Isolation and molecular characterization of *Cordyceps* sp. from *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and pathogenic *to Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e253028, 2022.

FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological control**, v. 43, n. 3, p. 237-256, 2007.)

GÊA, B. C. C. **Avaliação de fungos entomopatogênicos obtidos de diferentes ecossistemas brasileiros no controle biológico de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) e de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Proteção de Plantas) – Universidade Estadual de São Paulo. Botucatu, 2022.

JACKSON, M. A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 19, p. 180-187. 1997.

JARONSKI, S. T.; MASCARIN, G. M. Mass production of fungal entomopathogens. Microbial control of insect and mite pests, p. 141-155, 2017.

KOOYMAN, C.; GODONOU, I. Infection of *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) hoppers by *Metarhizium flavoviride* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) conidia in an oil formulation applied under desert conditions. **Bulletin of entomological research**, v. 87, n. 1, p. 105-107, 1997.

MASCARIN, G. M. *et al.* Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of invertebrate pathology**, v. 127, p. 11-20, 2015.

MASCARIN, G. M. *et al.* The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. **Biological control,** v. 66, n. 3, p. 209-218, 2013.

OTTATI-DE-LIMA, E. L. *et al.* Liquid production of entomopathogenic fungi and ultraviolet radiation and temperature effects on produced propagules. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, p. 342-350, 2014.

PANDEY, R.; KANAUJIA, K. R. Suitability of different synthetic and grain based liquid media for the mass culture of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. **Journal of Entomological Research**, v. 34, n. 4, p. 305-309, 2010.

RANGEL, D. E. N, *et al.* Conidial mass production of entomopathogenic fungi and tolerance of their mass-produced conidia to UV-B radiation and heat. **Fungal Biology**, v. 127, n. 12, p. 1524-1533, 2023.

ROJAS, V. M. A. *et al.* Characterization of Brazilian *Cordyceps fumosorosea* isolates: Conidial production, tolerance to ultraviolet-B radiation, and elevated temperature. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 197, p. 107888, 2023.

SALA, A. *et al.* Current developments in the production of fungal biological control agents by solid-state fermentation using organic solid waste. **Critical reviews in environmental science and technology**, v. 49, n. 8, p. 655-694, 2019.

SOUZA, R. K. F. *et al.* Conidial water affinity is an important characteristic for thermotolerance in entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 4, p. 448-461, 2014.

TAYLOR, B. *et al.* Yield and germination of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* when grown on different rice preparations. **Journal of stored products research**, v. 53, p. 23-26, 2013.

VEGA, F. E. *et al.* The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. **World journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 363-368, 2003.

WRAIGHT, S.; INGLIS, D. G.; GOETTEL, M. S. Fungi. In: LACEY, L. A.; KAYA, H. K. **Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**, Springer, 223-248p., 2007.

CAPÍTULO 2
PATOGENICIDADE DE *Cordyceps javanica* À LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Thiago Souza Bulhões[1]; Bianca Cristina Costa Gêa[1]; Bruno Felipe Prado de Melo[1]; Paula Leite dos Santos[1]; Maria Márcia Pereira Sartori[2]; Gabriel Moura Mascarin[3]; Carlos Frederico Wilcken[1].

[1]Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais, Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de ciências Agronômicas, FCA/UNESP – Campus de Botucatu, 18610-034, Botucatu, SP, Brasil.

[2]Departamento de Fitotecnia, Faculdade de ciências Agronômicas, FCA/UNESP – Campus de Botucatu, 18610-034, Botucatu, SP, Brasil.

[3]Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP-340, km 127.5, S/N - Tanquinho Velho, 13918-110 Jaguariúna, SP, Brasil.

2.1 INTRODUÇÃO

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das principais pragas causadoras de danos em cultivos de grande importância econômica. Esta espécie representa um problema global e possui ampla distribuição no Brasil, estando presente em praticamente todos os estados do país (Cruz, 1995; Sarmento *et al.*, 2002; Sharma; Kaur, 2022).

Na fase adulta apresenta coloração cinza-escura e envergadura de aproximadamente 4 cm. As fêmeas depositam seus ovos em grupos de 50 a 300 sobre as folhas, podendo chegar a uma média de 1000 ovos por fêmea. O período médio de incubação dos ovos é de 3 dias, enquanto as fases de larva, pupa e adulta têm durações médias de 25, 11 e 12 dias, respectivamente, resultando em um ciclo total de aproximadamente 51 dias (Sarmento *et al.*, 2002; Sharma; Kaur, 2022).

Quando recém-eclodidas, as lagartas de *Spodoptera frugiperda* se alimentam raspando as folhas e, a partir do segundo estágio de desenvolvimento, podem apresentar canibalismo. Por isso geralmente são encontradas uma por planta no campo e necessitam serem criadas de forma individualizada em laboratório. São conhecidas também como lagartas militares devido ao comportamento de migrarem

em grupo na falta de alimento. Ao fim do desenvolvimento, penetram no solo e empupam (Sharma; Kaur, 2022).

A intensidade dos danos causados pela lagarta é influenciada pelo vigor da planta e pelas condições climáticas. As larvas têm grande capacidade de deslocamento, enquanto os adultos possuem alta taxa de dispersão. Em regiões tropicais, os danos podem ser severos, chegando a causar uma redução de até 60% no rendimento de grãos (Russo *et al.*, 2021; Sharma; Kaur, 2022).

A alta taxa de oviposição, que possibilita a geração de grandes populações, juntamente com a grande voracidade das larvas, sua propensão em atacar uma ampla variedade de culturas e sua capacidade de migrar a longas distâncias, fazem de *S. frugiperda* uma das principais pragas na agricultura, causando grandes danos econômicos (Russo *et al.*, 2021).

O controle de *Spodoptera frugiperda* atualmente é realizado principalmente por meio do uso de produtos químicos, culturas modificadas geneticamente e o uso de baculovírus (Valicente; Tuelher, 2009; Abbas *et al.*, 2022). O uso de inimigos naturais também é bastante pesquisado, como a liberação de parasitoides de ovos (*Trichogramma* spp.;*Telenomus remus*), e o controle natural por vários parasitoides de lagartas das famílias Ichneumonidae e Braconidae (Hymenoptera) e Tachinidae (Diptera). Entre os predadores, o mais comum é a tesourinha *Doru luteipes* (Dermaptera: Forficulidae) (Cruz, 1995; Figueiredo *et al.*, 2006).

O uso de fungos entomopatogênicos no combate a *Spodoptera frugiperda* tem mostrado resultados promissores em diversos estudos. Os fungos demonstraram eficácia ovicida, comprometendo o desenvolvimento dos ovos e reduzindo a eclosão das lagartas. Além disso, a infecção fúngica pode interferir na performance alimentar das lagartas, diminuindo sua capacidade de se alimentar e crescer, o que consequentemente reduz os danos às culturas. Os fungos entomopatogênicos também causam a morte direta das lagartas por meio de infecção sistêmica, onde os esporos penetram no corpo do inseto, crescem internamente e levam à morte, culminando com o processo de extrusão. Esses efeitos combinados fazem dos fungos entomopatogênicos uma ferramenta potencial e sustentável no controle de *S. frugiperda*, contribuindo com o manejo integrado (Idrees *et al.*, 2021; Abbas *et al.*, 2022; Idrees *et al.*, 2023).

Diante da necessidade de encontrar alternativas mais sustentáveis e da busca contínua por novos isolados para o controle de pragas, este trabalho tem como objetivo avaliar a viabilidade do uso de fungos entomopatogênicos como uma alternativa eficaz no manejo de *Spodoptera frugiperda*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Fungos entomopatogênicos (FEP)

Os fungos entomopatogênicos utilizados no presente trabalho são pertencentes à coleção de FEP do LCBPF, preservados em meio de Castellani e em glicerina a 10% (-20 °C). Como controle comparativo foram também selecionados três produtos comerciais a base de fungo entomopatogênicos, sendo eles: Boveril® (*Beauveria bassiana*) Metarril® (*Metarhizium anisopliae*) e Octane® (*Cordyceps fumosorosea*) (Koppert ®).

2.2.2 Criação de *Spodoptera frugiperda*

Os insetos utilizados para os bioensaios foram obtidos em parceria com o Laboratório do Grupo de Pesquisa em Manejo Integrado de Pragas na Agricultura (AGRIMIP), do Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA / UNESP, Campus de Botucatu).

A criação de *S. frugiperda* foi mantida em sala climatizada (25 ± 1ºC, 70 ± 10% e fotofase de 12h). Os ovos de *S. frugiperda* foram postos em copos de 500 mL. Ao emergirem, as lagartas neonatas foram transferidas para dieta artificial desenvolvida por Greene, Leppla, Dickerson (1976) (Tabela 1), disposta em copos plásticos de 50 ml. Cada copo comportava duas lagartas.

Dentro dos copos foi realizado o acompanhamento da exúvia e troca da cápsula cefálica para identificação dos instares até a obtenção do instar desejado para os experimentos.

Tabela 1 – Composição da dieta artificial para *Spodoptera frugiperda* com quantidade suficiente para 280 lagartas

Ingredientes	Quantidade
Feijão branco	165g
Levedo de cerveja	50,50g
Germe de trigo	79,20g
Nipagim	3,15g
Ácido ascórbico	5,10g
Ácido Sórbico	1,65g
Terramicina	1ml
Caragenina	16g
Formaldeído P.A.	12ml
Vitamina	9ml
Água destilada	1200ml

Figura 1 – Lagartas de *Spodoptera frugiperda* em recipiente contendo dieta artificial

2.2.3 Viabilidade dos fungos

Todos os fungos tiveram a viabilidade avaliada antes dos ensaios. A viabilidade foi determinada depositando uma alíquota 100 µl da suspensão de conídios na concentração de $1x10^6$ conídios ml^{-1} preparada com Tween 80 (0,01% v/v), em placas de Petri (90 mm), contendo 15 ml de meio de cultura BDA suplementado com antibiótico sulfato de estreptomicina (0,01 $g.L^{-1}$)., e incubadas em BOD (25 ± 1 °C e fotofase de 12 h) por 18 h. O conídio foi considerado viável quando o tubo germinativo

se encontrava duas vezes maior que o diâmetro do esporo. Um total de 100 conídios por repetição foi contabilizado em microscópio óptico com amplificação de 400x, utilizando-se três repetições por isolado. Os fungos que apresentaram viabilidade acima de 90% foram utilizados no ensaio (Wraight; Inglis; Goettel, 2007).

2.2.4 Reativação e preparo do inóculo

Para a realização dos experimentos foram utilizados conídios aéreos e blastósporos. Os conídios aéreos utilizados foram reativados em placas de Petri (90 mm) contendo meio de cultura BDA mantidas em câmara tipo BOD (25 ± 1 °C e fotofase de 12h) por 10 dias. Os conídios foram obtidos através da raspagem superficial do meio de cultura com surfactante Tween 80 (0,01% v/v). A concentração da solução foi ajustada de acordo com a necessidade do experimento com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico.

No caso dos blastósporos, o meio líquido foi desenvolvido a partir de uma matriz tendo como base o meio de cultura desenvolvido por Jackson (1997). O inóculo foi produzido em Erlenmeyers de 250 ml, com volume de 50 ml, composto por 25 ml de meio basal, 20 ml de melaço de cana-de-açúcar (ICC ®), 5 ml do inóculo e 1,25 g Hy-Soy© (Kerry®).

Os Erlenmeyers foram incubados em shaker (C24 Incubator Shaker©, New Brunswick Scientific®) a 250 rpm, 25 ºC e fotoperíodo 12:12 h, por três dias. Ao fim da produção a concentração da solução foi avaliada e ajustada com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico.

A produção foi dividida em duas partes: a de pré-cultura e cultura. A diferença entre elas foi a concentração de açúcar e do inóculo. Para a pré-cultura, foi utilizada a fonte de carbono, melaço, a 20% (p/v) e o inóculo inicial foi utilizado na concentração $5x10^6$ conídios ml^{-1} provenientes das placas de BDA. Na cultura, por sua vez, a fonte de carbono foi utilizada a 35% (p/v) com inóculo inicial de $5x10^7$ blastósporos.ml^{-1}, proveniente da pré-cultura ajustada em câmara de Neubauer.

Os Erlenmeyers foram autoclavados a 121 ºC e 1 atm por 15 minutos. Após foram inoculados e incubados em shaker (C24 Incubator Shaker©, New Brunswick Scientific®) a 250 rpm, 25 ºC e fotoperíodo 12:12 h, por três dias. Ao fim da produção

a concentração da solução foi avaliada e ajustada de acordo com a necessidade com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico.

2.2.5 Screening de isolados de fungos entomopatogênicos em S*podoptera frugiperda*

De forma a selecionar o isolado mais patogênico, lagartas de 3º instar de *S. frugiperda* foram avaliadas junto de 17 isolados da coleção do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF), 3 produtos comerciais (Boveril® WP, isolado PL63 de *Beauveria bassiana*; Metarril® WP, isolado E9 de *Metarhizium anisopliae*; e Octane® SC, isolado 1296 de *Cordyceps javanica*) e uma testemunha, composta por solução de Tween 80 (0,01% v/v) (Tabela 2).

As lagartas foram passadas do copo plástico para placas de Petri (90mm) contendo papel filtro no fundo.

Foi usada concentração de $1x10^8$ conídios.ml^{-1}. O volume foi aplicado de acordo com a indicação de produtos biológicos a base de *Bacillus thuringiensis (*200 L ha^{-1}), tendo em vista que são os corriqueiramente utilizados. Foi determinada a relação com a área da placa de Petri obtendo um volume de 127 µL de suspensão. A aplicação foi feita em câmara de fluxo laminar com o auxílio de um aerógrafo de dupla ação (DB134k, Fenghua Bida Machinery Manufacture Co., China), a 25 cm de distância da placa de Petri, com pressão de trabalho de 10 PSI, conforme metodologia adaptada por Jordan *et al.* (2021).

As lagartas foram mantidas por 30 minutos nas placas após a aplicação dos isolados para melhor contato. Em seguida, foram transferidas em duplas para outras placas de Petri e mantidas em BOD a 25 ± 1 °C, com fotofase de 12 h.

As lagartas foram avaliadas e alimentadas com folha de milho branco não-transgênico diariamente. Cada tratamento foi composto por 8 lagartas acompanhadas por 8 dias. Caso identificado algum cadáver, esse foi removido da placa e submetido à desinfestação superficial com solução de hipoclorito de sódio (1% v/v) por 30 segundos e, posteriormente, lavado em água destilada autoclavada, por 30 segundos, seguido por transferência para a câmara úmida incubada em BOD (25 ± 1 °C e fotofase de 12 h), por até 15 dias. A confirmação da morte do inseto pelo fungo foi feita a partir do desenvolvimento de estruturas do fungo sobre o corpo do inseto na câmara úmida.

O isolado LCBPF 11 (*Cordyceps javanica*) foi selecionado para dar continuidade aos experimentos.

2.2.6 Patogenicidade de *Cordyceps javanica* a *Spodoptera frugiperda*

Para avaliar a patogenicidade, bem como determinar a concentração letal média (CL50) e o tempo letal médio (TL50) do isolado LCBPF 11 (*C. javanica*) para *S. frugiperda*, foram preparadas cinco diferentes concentrações do isolado, tanto na forma de conídios aéreos quanto na forma de blastósporos. As concentrações utilizadas foram: $1x10^6$, $5x10^6$, $1x10^7$, $5x10^7$ e $1x10^8$ conídios / blastósporo ml^{-1}.

O estágio larval da lagarta, o volume e a forma de aplicação foram os mesmos que foram explicitados anteriormente. No entanto, após a aplicação, as lagartas foram transferidas para bandejas com compartimentos individuais devido ao seu comportamento canibalista.

Os compartimentos possuíam um pedaço de algodão umidificado para manutenção da umidade e foram limpos diariamente durante a avaliação do experimento e a troca de alimento (Figura 2).

Durante a aplicação dos tratamentos na concentração de $1x10^8$ conídios.ml^{-1}, também foi realizada com o aerógrafo, a aplicação em 5 lamínulas, que posteriormente foram lavadas em 10 mL de Tween 80 (0,01% v/v). A lavagem foi contada em uma câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio de luz, para obter a quantidade de conídios aplicada sobre o inseto por cm^2.

Figura 2 – Lagartas de *Spodoptera frugiperda* dispostas em bandejas em sala controlada durante bioensaio com *Cordyceps javanica* (temperatura 25±1ºC e fotofase de 12h)

Cada concentração constituiu um tratamento e cada tratamento foi composto por 12 lagartas em 5 repetições. O experimento foi feito em duplicata.

As lagartas foram mantidas em sala controlada (25 ± 1 °C e fotofase de 12 h) e avaliadas diariamente até a identificação da morte ou empupamento delas. Caso houvesse algum cadáver, o processo de desinfecção e confirmação de mortalidade também era feito por meio da câmara úmida como citado acima.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 21 tratamentos realizados no screening, 12 resultaram em alguma mortalidade em *S. frugiperda* (Tabela 2), enquanto os produtos comerciais utilizados não apresentaram efeito algum.

Desses 12, se destacam os isolados LCBPF 11, 31, 46, 79 e 80, que obtiveram nível de controle mínimo de 80%.

Tabela 2 – Mortalidade acumulada dos diferentes isolados de fungos entomopatogênicos para o ensaio de patogenicidade em *Spodoptera frugiperda* após 8 dias. temperatura 25±1ºC e fotofase de 12h)

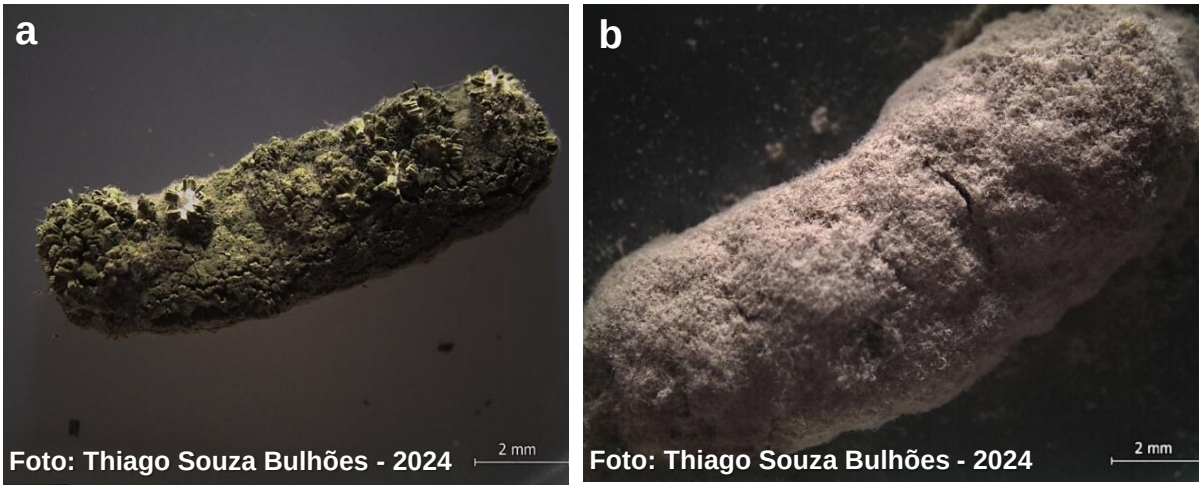
Tratamento	Espécie	Hospedeiro	Cultura de origem	Origem geográfica	Mortalidade acumulada (%)
Testemunha	-	-	-	-	-
Boveril®	*Beauveria bassiana*	-	-	-	0
LCBPF 23	*Beauveria bassiana*	*Tenebrio molitor*	Mata nativa	Botucatu - SP	25.00 ± 0.43
LCBPF 46	*Beauveria bassiana*	*Tenebrio molitor*	Mata nativa	Botucatu - SP	100.00 ± 0.43
LCBPF 62	*Beauveria bassiana*	*Tenebrio molitor*	Eucalipto	Cruzeiro do Sul - PR	75.00 ± 0.43
LCBPF 02	*Cordyceps amoene-rosea*	*Tenebrio molitor*	Eucalipto	Agudos - SP	0
LCBPF 17	*Cordyceps cateniannulata*	*Tenebrio molitor*	Mata nativa	Botucatu - SP	0
Octane®	*Cordyceps javanica*	-	-	-	0
LCBPF 11	*Cordyceps javanica*	*Bemisia tabaci*	Soja	Botucatu - SP	83.33 ± 0.83
LCBPF 12	*Cordyceps javanica*	*Bemisia tabaci*	Tomate	Botucatu - SP	0
Metarril®	*Metarhizium anisopliae*	-	-	-	0
LCBPF 31	*Metarhizium anisopliae*	*Tenebrio molitor*	Soja	Botucatu - SP	100.00 ± 0.43
LCBPF 60	*Metarhizium anisopliae*	*Tenebrio molitor*	Mata nativa	Mandaguaçu - PR	66.67 ± 0,71
LCBPF 79	*Metarhizium anisopliae*	*Tenebrio molitor*	Mata nativa	Maranhão	100.00
LCBPF 80	*Metarhizium anisopliae*	*Tenebrio molitor*	Mata nativa	Maranhão	80.00 ± 0.71
LCBPF 104	*Metarhizium anisopliae*	*Tenebrio molitor*	Soja	Maranhão	50.00 ± 0.50
LCBPF 08	*Metarhizium robertsii*	*Tenebrio molitor*	Eucalipto	Agudos - SP	25.00 ± 0.43
LCBPF 100	*Metarhizium robertsii*	*Tenebrio molitor*	Soja	Maranhão	33.33 ± 0.87
LCBPF 77	*Metarhizium robertsii*	*Tenebrio molitor*	Mata nativa	Maranhão	40.00 ± 0.87
LCBPF 96	*Purpureocillium lilacinum*	*Tenebrio molitor*	Soja	Maranhão	0
LCBPF 98	*Purpureocillium lilacinum*	*Tenebrio molitor*	Eucalipto	Maranhão	0

Dentre os com maior mortalidade acumulada, o isolado LCBPF 11 foi selecionado para dar continuidade ao experimento, sendo utilizado para determinar a CL_{50} e a TL_{50}. No entanto, quando o experimento foi realizado com amostragem mais ampla, não apresentou a mesma eficácia observada no screening, resultando em mortalidade nula durante o experimento, que foi finalizado após o empupamento das lagartas.

Tabela 3 – Quantidade de propágulos cm^{-2} aplicados na superfície de *Spodoptera frugiperda* para inóculo equivalentel a $1x10^8$ propágulo.ml^{-1}

Isolado	Fungo	Tipo	Propágulos cm^{-2}
LCBPF 11	*Cordyceps javanica*	Conídio aéreos	$4,4x10^4$
LCBPF 11	*Cordyceps javanica*	Blastósporos	$6,0x10^4$

Figura 3 – Registro de extrusão em lagarta de *Spodoptera frugiperda*: a) isolado LCBPF 31 (*Metarhizium anisopliae)*; b) LCBPF 11 (*Cordyceps javanica)*



O controle de *Spodoptera frugiperda* tem sido feito mediante o uso de químicos e por meio do controle biológico com baculovírus e *Bacillus thuringiensis* (Bt), entretanto algumas dessas metodologias já apresentam alguma resistência. Com a expansão do ataque da lagarta para diversas regiões do mundo, a busca por maior número de alternativas se torna crucial (Paredes-Sànches *et al.*, 2021; Abbas *et al.*, 2022).

Devido ao destaque da lagarta como praga, considerando a pouca especificidade, alta taxa de fertilidade e dano rápido a cultivos de grande importância econômica, diversos estudos atuais podem ser encontrados na literatura, incluindo metodologias de manejo utilizando fungos entomopatogênicos. Estes incluem metodologias de manejo que utilizam fungos entomopatogênicos, com destaque para *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, entre outros. No entanto, há poucos registros sobre o uso de *Cordyceps javanica* (Rajula *et al.*, 2021; Gotti *et al.*, 2023; Idrees *et al.*, 2023).

Contra outro lepidóptero, *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae), *C. javanica* apresentou certa mortalidade, mas foi dependente do instar da larva, obtendo valores acima de 50% de mortalidade somente no 1º e 2º instares, com concentrações altas de inóculo a partir de $1x10^8$ conídios ml^{-1} (Baja *et al.*, 2020).

A importância de estudos *in vitro* está justamente na identificação das delimitações e potencial de um isolado. Como aconteceu no trabalho em questão, em que o isolado LCBPF 11 foi selecionado devido sua eficácia no screening, porém falhou em taxa amostral maior, que pode ser resultado de diversos fatores. Um mesmo isolado com ótimos parâmetros em laboratório pode não ser tão eficiente quando em uma produção em larga escala ou no campo.

2.4 CONCLUSÕES

Os produtos comerciais e os isolados testados foram ineficazes contra lagartas de *Spodoptera frugiperda*.

O isolado LCBPF 11 de *C. javanica*, apesar de ter mostrado alta taxa de mortalidade no screening, não é efetivo no controle de lagartas de S. frugiperda. não se mostrou eficaz no controle da lagarta. Portanto, recomenda-se a realização de experimentos futuros com outros isolados que apresentaram alta taxa de mortalidade na triagem inicial, bem como testes com diferentes estágios de desenvolvimento (instares) da lagarta, para identificar soluções mais eficazes no manejo desta praga.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. *et al.* Biological control of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Agronomy**, v. 12, n. 11, p. 2704, 2022.

BAJA, F. *et al.* Infection of *Beauveria bassiana* and *Cordyceps javanica* on different immature stages of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). **Crop Protection**, v. 138, p. 105347, 2020.

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 1995. 45 p.

GOTTI, I. A. *et al.* Blastospores from *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium rileyi* are not always as virulent as conidia are towards *Spodoptera frugiperda* caterpillars and use different infection mechanisms. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1594, 2023.

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. *Velvetbean caterpillar*: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of economic entomology**, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

IDREES, A. *et al.* Effectiveness of entomopathogenic fungi on immature stages and feeding performance of Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae. **Insects**, v. 12, n. 11, p. 1044, 2021.

IDREES, A. *et al.* Virulence of entomopathogenic fungi against fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 1107434, 2023.

JACKSON, M. A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 19, p. 180-187. 1997.

JORDAN, C. *et al.* Entomopathogenic fungi as the microbial frontline against the alien *Eucalyptus* pest *Gonipterus platensis* in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 7233, 2021.

PAREDES-SÁNCHEZ, F. A. *et al.* Advances in control strategies against *Spodoptera frugiperda*. A review. **Molecules**, v. 26, n. 18, p. 5587, 2021.

RAJULA, J. *et al.* Evaluation of native entomopathogenic fungi for the control of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in Thailand: A sustainable way for eco-friendly agriculture. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 12, p. 1073, 2021.

RUSSO, M. L. *et al.* Effect of entomopathogenic fungi introduced as corn endophytes on the development, reproduction, and food preference of the invasive fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pest Science**, v. 94, n. 3, p. 859-870, 2021.

SARMENTO, R. A. *et al.* Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 2, 2002.

SHARMA, S.; KAUR, T. Invasion of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), a global threat to maize crop: A review. **The Pharma Innovation Journal**, v. 11, p. 101-112, 2022.

WRAIGHT, S.; INGLIS, D. G.; GOETTEL, M. S. Fungi. In: LACEY, L. A.; KAYA, H. K. **Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**, Springer, 223-248p., 2007.

CAPÍTULO 3
USO DE PROPÁGULOS DE *Metarhizium anisopliae* NO CONTROLE DE *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)

Thiago Souza Bulhões[1]; Bianca Cristina Costa Gêa[1]; Bruno Felipe Prado de Melo[1]; Paula Leite dos Santos[1]; Maria Márcia Pereira Sartori[2]; Gabriel Moura Mascarin[3]; Carlos Frederico Wilcken[1].

[1]Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais, Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de ciências Agronômicas, FCA/UNESP – Campus de Botucatu, 18610-034, Botucatu, SP, Brasil.

[2]Departamento de Fitotecnia, Faculdade de ciências Agronômicas, FCA/UNESP – Campus de Botucatu, 18610-034, Botucatu, SP, Brasil.

[3]Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP-340, km 127.5, S/N - Tanquinho Velho, 13918-110 Jaguariúna, SP, Brasil.

3.1 INTRODUÇÃO

Thaumastocoris peregrinus (Hemiptera: Thaumastocoridae), popularmente conhecido como percevejo bronzeado, é uma praga de grande relevância econômica para plantações de eucalipto em diversos países produtores. Originário da Austrália, se alimenta da sucção das folhas, causando desfolhamento significativo nas árvores (Nadel; Noack, 2012). No Brasil foi identificado pela primeira vez em 2008 e se espalhou rapidamente por todo o país (Wilcken *et al.*, 2010).

O controle químico é uma opção viável para o manejo de *T. peregrinus*, especialmente durante surtos populacionais da praga. No entanto, essa abordagem apresenta sérios desafios e limitações. O uso de pesticidas químicos está associado a riscos de impactos ambientais, além de efeitos adversos sobre organismos não-alvo. As restrições impostas por órgãos de certificação florestal, que visam promover práticas mais sustentáveis e ecológicas, também limitam o uso extensivo de produtos químicos. Dessa forma, há necessidade crescente de explorar e implementar métodos de controle mais sustentáveis e eficazes, como o uso de agentes biológicos e práticas de manejo integrado de pragas (Wilcken *et al.*, 2019).

Atualmente, o controle biológico do percevejo bronzeado é feito principalmente pelo uso do parasitoide de ovos, *Cleruchoides noackae* Lin & Huber, 2007 (Hymenoptera: Mymaridae). Ele foi introduzido no Brasil em 2012 por meio de uma

força tarefa coordenada pelo Programa de Proteção Florestal / Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (PROTEF/IPEF) (Barbosa *et al.*, 2017) e desde a sua introdução tem se mostrado uma tática de controle eficiente (Barbosa *et al.*, 2017; Andorno *et al.*, 2022).

Além do uso do parasitoide, há vários estudos sobre fungos entomopatogênicos de ocorrência natural infectando ninfas e/ou adultos de *T. peregrinus,* como *Zoophthora radicans* (Entomophthorales) (Mascarin *et al.*, 2012) e *Fusarium proliferatum, F. tricinctum e F. equise*ti (Hypocraeles) (Moio, 2015). Porém, há pesquisas avaliando fungos entomopatogênicos de uso mais aplicado, comoo *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, com bons resultados (Santos *et al.*, 2018; Wilcken *et al.*, 2019; Tedesco *et al.*, 2020) e que até mesmo alcançaram níveis de controle semelhantes aos dos inseticidas químicos em um mesmo intervalo de tempo (Wilcken *et al.*, 2019).

Diante do potencial dano causado pelo percevejo bronzeado, é fundamental desenvolver e implementar múltiplas estratégias de controle para minimizar os impactos nas plantações. O clima brasileiro, por ser uma país de clima tropical, favorece o desenvolvimento e a ação de fungos entomopatogênicos. Considerando esses fatores, o trabalho em questão buscou avaliar o uso de dois tipos de propágulos de *M. anisopliae*, visando uma forma de controle complementar ao controle do percevejo bronzeado.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Fungos entomopatogênicos (FEP)

O isolado LCBPF 31 de *Metarhizium anisopliae* foi utilizada neste estudo e produzida de diferentes formas. O fungo faz parte da coleção de FEP do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF) e é preservado pelo método de Castellani e em glicerina a 10% (-20 °C). Como controle positivo, foi adquirido o produto comercial Metarril® da Koppert, enquanto uma solução de Tween 80 (0,01% v/v) foi utilizada como testemunha (Tabela 1).

Tabela 1 – Produtos e isolados de *Metarizium anisopliae*, com diferentes tipos de propágulos, utilizados no controle de *Thaumastoocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) em condições de laboratório

Isolado/Produto	Fungo	Tipo
Metarril®	*Metarhizium anisopliae*	Conídio aéreos
LCBPF 31	*Metarhizium anisopliae*	Conídio aéreos
LCBPF 31	*Metarhizium anisopliae*	Blastósporos (FDL)
LCBPF 31	*Metarhizium anisopliae*	Blastósporos (Farinha)
Testemunha	-	Tween 80

Blastósporos (FDL): Blastôsporos produzidos a partir do meio de cultura Farinha-Dextrose-Levedura.
Blastósporos (Farinha): Blastôsporos produzidos a partir do meio de cultura composto por farinha de arroz

3.2.2 Criação do percevejo

Os insetos utilizados nos ensaios laboratoriais foram obtidos a partir da criação do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF), do Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP). Somente adultos da criação em laboratório foram utilizados nos bioensaios.

A criação foi mantida em sala climatizada a 24 ± 2ºC, UR de 60 ± 10% e fotofase de 12 h. Os adultos foram coletados com o auxílio de pincel durante os experimentos.

3.2.3 Viabilidade dos fungos

Todos os fungos tiveram a viabilidade avaliada antes dos ensaios. A viabilidade foi determinada depositando uma alíquota 100 µl da suspensão de conídios na concentração de $1x10^6$ conídios ml^{-1} preparada com Tween 80 (0,01% v/v), em placas de Petri (90 mm) contendo 15 ml de meio de cultura BDA suplementado com antibiótico sulfato de estreptomicina (0,01 $g.L^{-1}$)., e incubadas em BOD (25 ± 1 °C e fotofase de 12 h) por 18 h. O conídio era considerado viável quando o tubo germinativo se encontrava duas vezes maior que o diâmetro do esporo. Um total de 100 conídios por repetição foi contabilizado em microscópio óptico com amplificação de 400x,

utilizando-se três repetições por isolado. Os fungos que apresentaram viabilidade acima de 90% foram utilizados no ensaio (Wraight; Inglis; Goettel, 2007).

3.2.4 Obtenção do inóculo em fase sólida

Para a realização dos experimentos foram utilizados conídios aéreos e blastósporos. Os conídios aéreos utilizados foram reativados em placas de Petri (90 mm) contendo meio de cultura BDA mantidas em câmara tipo BOD (25 ± 1 °C e fotofase de 12h) por 10 dias. Os conídios foram obtidos através da raspagem superficial do meio de cultura com surfactante Tween 80 (0,01% v/v). A concentração da solução foi ajustada para $1x10^8$ conídios ml^{-1} com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico.

3.2.5 Obtenção do inóculo em fase líquida

Para blastósporos, o meio líquido foi desenvolvido a partir de uma matriz tendo como base o meio de cultura desenvolvido por Jackson (1997). Foram utilizados dois meios líquidos diferentes, um denominado Farinha – Dextrose – Levedura (FDL) e o outro denominado Farinha. No primeiro caso, foi composto por 24 ml de meio basal, 20 ml de dextrose, 5 ml do inóculo, 1,25 g de levedura e 1,25 g de farinha de arroz, em Erlenmeyers de 250 ml. O segundo, denominado Farinha, foi composto somente pela farinha de arroz em 2,25g, o meio basal a 47,75 ml e o inóculo com 5 ml.

A produção foi dividida em duas etapas: pré-cultura e cultura. A diferença entre elas foi a concentração de açúcar e do inóculo. Na pré-cultura, utilizou-se dextrose a 20% (p/v) como fonte de carbono, com um inóculo inicial de $5x10^6$ conídios ml^{-1} provenientes das placas de BDA. Já na cultura, a fonte de carbono foi aumentada para 35% (p/v), com um inóculo inicial de $5x10^7$ blastósporos.ml^{-1}, provenientes da pré-cultura.

Os Erlenmeyers foram incubados em shaker (C24 Incubator Shaker©, New Brunswick Scientific®) a 250 rpm, 25 ºC e fotoperíodo 12:12 h, por três dias. Ao fim da produção a concentração da solução foi avaliada e ajustada para $1x10^8$ blastósporos.ml^{-1} com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico.

3.2.6 Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* a *Thaumastocoris peregrinus*

Todos os tratamentos foram aplicados a uma concentração de $1x10^8$ conídios ml^{-1}. O volume aplicado foi determinado conforme a indicação do produto comercial Metarril® (Koppert®), que também possui *M. anisopliae* como agente biológico e recomenda o volume de calda de 250 L ha^{-1}. Foi feita a estimativa de área de campo com a área da placa de Petri, resultando em um volume de 159 µL de suspensão/placa.

Para aplicação, foram separados 12 adultos sobre um pedaço de folha de *E. urophylla* var. *platyphylla*, clone 433 dispostas em placas de Petri. A aplicação foi feita em fluxo laminar com o auxílio de um aerógrafo de dupla ação (DB134k, Fenghua Bida Machinery Manufacture Co., China), a 25 cm de distância da placa de Petri, com pressão de trabalho de 10 PSI, conforme metodologia adaptada por Jordan *et al.* (2021).

Durante a aplicação cada tratamento também foi aplicado em 5 lamínulas que posteriormente foram lavadas em 10 mL de Tween 80 (0,01% v/v). A lavagem foi contada em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio de luz para obtenção da quantidade de conídios que estava sendo aplicada sobre o inseto por cm^2.

Os percevejos foram mantidos nas placas por 30 minutos após a aplicação dos isolados para facilitar a absorção. Em seguida, foram transferidos para outras placas de Petri contendo uma folha de *Eucalyptus urophylla var. platyphylla*, clone 433. Desta vez, a folha estava colocada sobre gel hidrorretentor para reduzir a perda de turgidez e evitar a fuga dos insetos (Figura 1).

Figura 1 – Placa de Petri com *Thaumastocoris peregrinus* e folha de *Eucalyptus* sobre gel hidrorretentor

As placas foram mantidas em incubadoras tipo B.O.D. a temperatura de 25,0 ± 1,0 °C, umidade relativa de 83,0 ± 2,0% e fotoperíodo de 12h. Cada repetição (placa de Petri) foi observada diariamente durante 7 dias.

Quando mortos os insetos eram contabilizados, submetidos à desinfestação superficial com solução de hipoclorito de sódio (1% v/v) por 30 segundos e posteriormente lavados em água destilada autoclavada, por 30 segundos para então serem transferidos para câmaras úmidas que foram incubadas em BOD (25 ± 1 °C e fotofase de 12 h), por até 15 dias. A confirmação da morte do inseto pelo fungo foi feita a partir desenvolvimento de estruturas do fungo sobre o corpo do inseto na câmara úmida.

3.2.7. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e cinco repetições, cada uma contendo 12 adultos. O bioensaio completo foi realizado em duplicata, totalizando os dados agrupados para análise (n=10 repetições por tratamento).

Os dados do bioensaio de patogenicidade foram analisados utilizando análise de sobrevivência. O estimador de Kaplan-Meier foi utilizado para calcular as probabilidades de sobrevivência e plotar as curvas de sobrevivência ao longo do tempo. Para calcular os tempos letais médios precisos (TL_{50}) e seus respectivos intervalos de confiança de 95%, foi aplicado um modelo paramétrico de sobrevivência de Weibull. As diferenças entre as curvas de sobrevivência foram avaliadas pelo teste de Log-rank. Quando diferenças significativas foram detectadas, realizaram-se comparações pareadas de Log-rank com ajuste de valor de *p* de Benjamini-Hochberg. Além disso, o modelo de riscos proporcionais de Cox foi empregado para calcular a Razão de Risco (Hazard Ratios - HR), utilizando o produto comercial Metarril® como referência basal para quantificar a virulência relativa dos propágulos fúngicos. Adicionalmente, a mortalidade acumulada final ao término do período de cinco dias de avaliação foi comparada entre os tratamentos. Como esses dados não atenderam às premissas paramétricas, as diferenças estatísticas foram determinadas usando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste da Diferença Mínima Significativa (LSD) de Fisher em postos ($p < 0,05$). Todas as análises foram conduzidas no software R (R Core Team 2025), utilizando o pacote 'MASS' para a

modelagem probit, os pacotes 'survival' e 'survminer' para a modelagem de sobrevivência, e o pacote 'agricolae' para as comparações múltiplas não paramétricas.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os tratamentos fúngicos foram aplicados a uma concentração superior a 1×10^5 propágulos.cm^{-2}, com exceção dos blastósporos obtidos no meio à base de Farinha ($3{,}75 \times 10^4$ propágulos cm^{-2}) (Tabela 2).

Tabela 2 – Quantidade de propágulos cm^{-2} de *M. anisopliae* aplicados de forma tópica em adultos de *Thaumastocoris peregrinus*

Isolado	Fungo	Tipo	Propágulo cm^{-2}
Metarril®	*Metarhizium anisopliae*	Conídio aéreo	1,86x10^5
LCBPF 31	*Metarhizium anisopliae*	Conídio aéreo	1,36x10^5
LCBPF 31	*Metarhizium anisopliae*	Blastósporo (FDL)	1,57x10^5
LCBPF 31	*Metarhizium anisopliae*	Blastósporo (Farinha)	3,75x10^4

A patogenicidade foi confirmada macroscopicamente pela extrusão micelial nos cadáveres (Figura 4A). Todos os tratamentos fúngicos resultaram em uma redução drástica na sobrevivência, alcançando mortalidade absoluta (100%) nos adultos de *T. peregrinus* aos cinco dias após a inoculação (DAA), enquanto a testemunha manteve alta sobrevivência ao longo de todo o período experimental.

A análise de sobrevivência demonstrou diferenças altamente significativas na dinâmica de mortalidade entre os tratamentos avaliados (Teste Log-rank: $\chi^2 = 533{,}6$; $gl = 4$; $p < 0{,}0001$) (Figura 4B). O modelo paramétrico de Weibull permitiu a estimativa precisa dos tempos letais médios (TL_{50}), revelando que os blastósporos produzidos no meio FDL exibiram a ação mais rápida, atingindo o TL_{50} em apenas 1,81 dias (Tabela 3). Essa ação foi significativamente mais rápida que o padrão comercial Metarril®, que atingiu 50% de mortalidade aos 2,49 dias. Notavelmente, as comparações pareadas de Log-rank confirmaram que a curva de probabilidade de sobrevivência dos blastósporos oriundos do meio FDL foi significativamente inferior (indicando mortalidade mais rápida) a todos os outros tratamentos, incluindo o padrão comercial ($p < 0{,}05$, indicado pelas letras sobrescritas distintas na Figura 4B). Para quantificar essa superioridade, um modelo de riscos proporcionais de Cox foi aplicado,

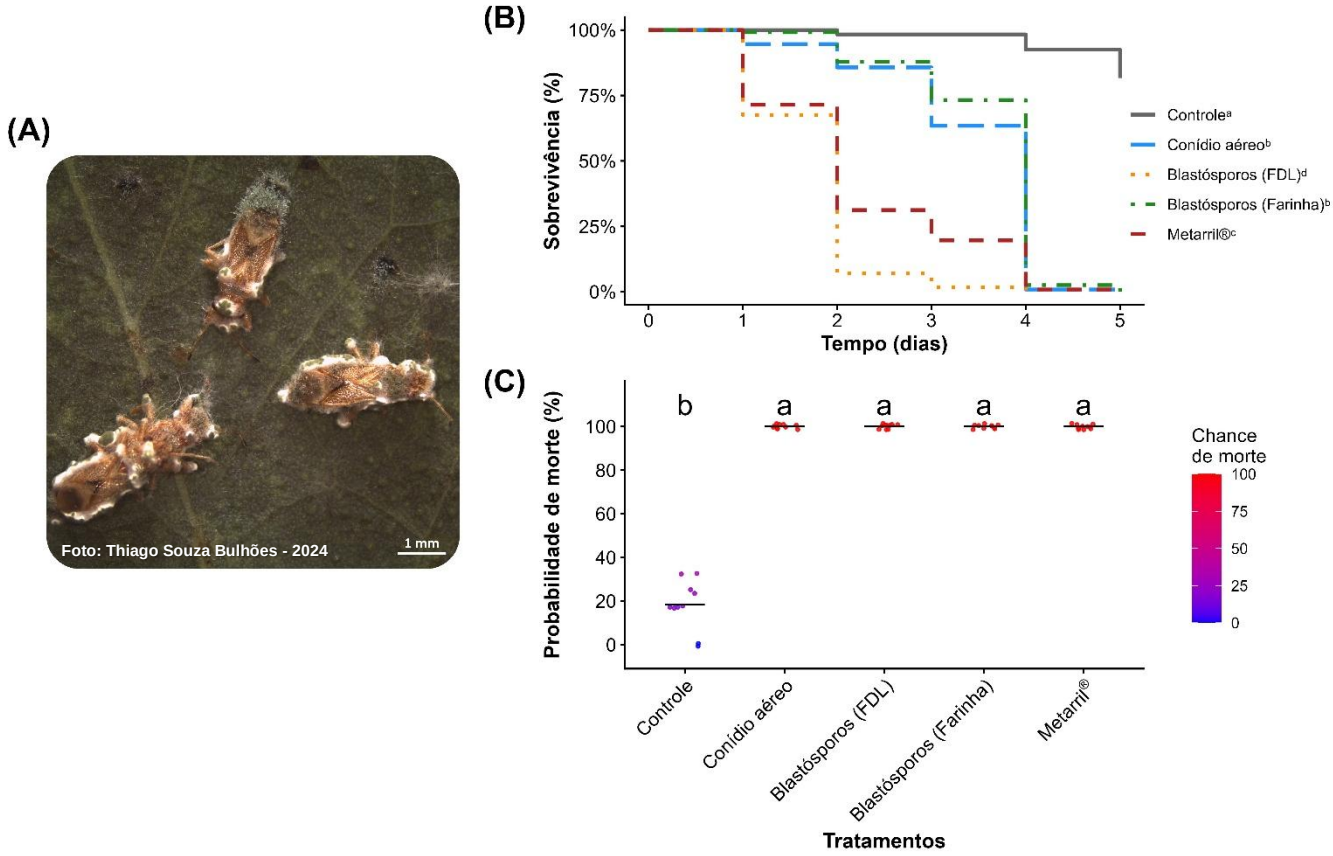
utilizando o Metarril® como referência basal. O modelo confirmou que os blastósporos (FDL) exibiram uma virulência notavelmente superior, com uma Razão de Risco (Hazard Ratio - HR) de 2,51 (IC 95%: 1,90–3,31), indicando uma taxa de mortalidade 2,5 vezes maior que o produto comercial. Por outro lado, os conídios aéreos e os blastósporos produzidos em meio com Farinha demonstraram virulência significativamente menor em comparação ao padrão, com Razões de Risco de 0,43 e 0,37, respectivamente, e tempos letais médios (TL_{50}) mais lentos, de 3,28 e 3,39 dias (Tabela 3). Adicionalmente, a análise da probabilidade de morte acumulada final aos 5 DAA corroborou a letalidade absoluta de todos os propágulos avaliados em comparação ao grupo controle (Kruskal-Wallis seguido pelo teste LSD de Fisher em postos, $p < 0,05$; Figura 4C).

Tabela 3 – Tempo letal médio (TL_{50}, em dias) e razão de risco (Hazard Ratio) para adultos de *Thaumastocoris peregrinus* tratados com diferentes propágulos de *Metarhizium anisopliae* (25 ± 1 °C; fotofase de 12 h)

Tratamento	LT_{50} (95% CI)	Hazard Ratio (95% CI)
Blastósporo (FDL)	1,81 (1,70–1,91)	2,51 (1,90–3,31)
Metarril®	2,49 (2,34–2,64)	1,00 (Referência)*
Conídio aéreo	3,28 (3,09–3,46)	0,43 (0,33–0,56)
Blastósporo (Farinha)	3,39 (3,21–3,58)	0,37 (0,29–0,48)
Controle	> 5	0,01 (0,01–0,02)

Os valores de TL_{50} foram estimados utilizando o modelo paramétrico de sobrevivência de Weibull. *As Razões de Risco (Hazard Ratios - HR) foram calculadas através do modelo de riscos proporcionais de Cox, utilizando a formulação comercial de dispersão em óleo (OD) à base de conídios aéreos de *M. anisopliae* (Metarril®) como referência basal. FDL: Blastósporos produzidos a partir do meio de cultura Farinha-Dextrose-Levedura. Farinha: Blastôsporos produzidos a partir do meio de cultura composto por farinha de arroz.

Figura 4 – Patogenicidade e análise de sobrevivência de adultos de *Thaumastocoris peregrinus* infectados com diferentes propágulos de *Metarhizium anisopliae* (25 ± 1 °C; fotofase de 12 h)



(A) Visualização macroscópica de cadáveres de *T. peregrinus* sofrendo extrusão micelial após infecção com blastósporos (FDL). (B) Estimativas de sobrevivência de Kaplan-Meier ao longo de um período de cinco dias. Os tratamentos avaliados incluem blastósporos produzidos em dois meios líquidos distintos (FDL e Farinha), conídios aéreos, uma formulação comercial em dispersão de óleo à base de conídios aéreos de *M. anisopliae* (Metarril®) e um grupo controle (Tween 80 a 0,05%). Letras sobrescritas diferentes na legenda denotam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com comparações pareadas usando o teste de Log-rank com ajuste de Benjamini-Hochberg ($p < 0,05$). (C) Probabilidade final de morte (%) entre os tratamentos ao final do período de avaliação de cinco dias. As barras horizontais pretas representam os valores médios de cada grupo. Letras minúsculas diferentes acima dos pontos de dados indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste da Diferença Mínima Significativa (LSD) de Fisher em postos ($p < 0,05$). O gradiente de cor indica a chance de morte, variando de 0 (azul) a 100 (vermelho). FDL: Blastósporos produzidos a partir do meio de cultura Farinha-Dextrose-Levedura. Farinha: Blastôsporos produzidos a partir do meio de cultura composto por farinha de arroz.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Este trabalho soma-se aos estudos anteriores conduzidos por Soliman (2014) e Soliman *et al*. (2019). No bioensaio de patogenicidade, todos os propágulos de M. anisopliae causaram mortalidade de 100% em adultos de T. peregrinus em apenas cinco dias, indicando a alta eficácia do isolado LCBPF 31. Essa rápida velocidade de ação representa um avanço significativo em relação aos achados anteriores do nosso

grupo de pesquisa, onde mortalidades superiores a 80% usando suspensões de conídios foram alcançadas apenas aos 11 dias após a aplicação (Soliman *et al.*, 2019).

Uma comparação detalhada entre os propágulos, suportada pelo modelo paramétrico de Weibull, revelou que a ação mais rápida foi alcançada pelos blastósporos (meio FDL), que atingiram o TL_{50} em apenas 1,81 dias. Este propágulo produzido em meio líquido superou significativamente até mesmo o padrão comercial Metarril® (TL_{50} = 2,49 dias), demonstrando a virulência superior dos blastósporos de ação rápida. Em outros estudos, resultados semelhantes de eficiência podem ser encontrados. Com outra cepa de *M. anisopliae*, Velozo *et al.* (2023) também obtiveram mortalidade superior a 80% em 5 dias. Já em contraste com os resultados obtidos em 4 DAA nesse estudo, Almeida *et al.* (2020) alcançaram 100% de mortalidade em 5 dias de experimento utilizando *Beauveria bassiana*, enquanto Corallo *et al.* (2019) obtiveram 98% de mortalidade em 6 dias com o mesmo fungo. Além disso, Corallo *et al.* (2019) também alcançaram 80% de mortalidade com *Cordyceps javanica* em 10 dias.

Embora estudos anteriores já tenham estabelecido a suscetibilidade do percevejo-bronzeado a conídios aéreos (Soliman *et al.*, 2019; Wilcken *et al.*, 2019; Domingues *et al.*, 2020; Velozo *et al.*, 2023) e a propágulos submersos de *Beauveria bassiana* (Abreo *et al.*, 2019), até onde se sabe, este é o primeiro relato documentado demonstrando a severa patogenicidade e rápida virulência de blastósporos de *Metarhizium* contra *T. peregrinus*. Isso representa um avanço tecnológico considerável, uma vez que os blastósporos oferecem naturalmente a vantagem de uma ação mais rápida em comparação aos conídios aéreos derivados de substratos sólidos (Sala *et al.*, 2019). Além disso, sob uma perspectiva industrial e econômica, a fermentação líquida submersa é um processo altamente escalável e de baixo custo (Mascarin *et al.*, 2024). Ela soluciona os principais gargalos da produção tradicional em estado sólido, reduzindo drasticamente a necessidade de grandes espaços físicos, mão de obra intensiva e volumes massivos de substratos agrícolas, como o arroz.

A alta velocidade de ação do Metarril®, apesar de ser à base de conídios, deve-se provavelmente à sua formulação comercial em dispersão em óleo (OD), que contém aditivos que melhoram a aderência e a virulência do fungo. Em contrapartida, os propágulos produzidos no meio composto apenas por farinha de arroz (M2)

apresentaram uma ação mais lenta. Isso sugere que a deficiência nutricional (especificamente a limitação de nitrogênio) durante a produção prejudicou a qualidade ou virulência do propágulo, evidenciado pelo seu TL_{50} (3,39 dias) ser quase o dobro daquele obtido no meio M1. Essa descoberta ressalta a necessidade crítica de suplementação nutricional (como, por exemplo, o extrato de levedura) para garantir a produção de blastósporos de alto desempenho.

3.4 CONCLUSÕES

A expressiva virulência do isolado LCBPF 31 de *Metarhizium anisopliae*, evidenciada pelo curto tempo letal, atesta o seu elevado potencial para integração em táticas de controle biológico contra *Thaumastocoris peregrinus*.

Destaca-se o desempenho superior dos blastósporos produzidos em meio líquido suplementado (FDL), que aliam a quebra de paradigma na velocidade de ação inseticida à viabilidade de uma produção industrial escalável. Contudo, por se tratar de uma prospecção *in vitro*, a condução de ensaios subsequentes em condições de semi-campo e campo faz-se indispensável. Tais estudos são essenciais para validar a eficácia agronômica, a persistência e a estabilidade das formulações baseadas nesses propágulos frente às intempéries ambientais.

REFERÊNCIAS

ABREO, E. *et al.* Dual selection of *Beauveria bassiana* strains and complex substrate media for the massive production of submerged propagules with activity against the eucalyptus bronze bug *Thaumastocoris peregrinus*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, n. 6, p. 533-546, 2019.

ALMEIDA, K. E. C. *et al.* Virulence and selection of *Beauveria bassiana* for the control of *Thaumastocoris peregrinus*. **Floresta e Ambiente**, v. 27, 2020.

ANDORNO, A. V. *et al.* Biological control of the Eucalyptus bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) in Argentina: release and recovery of the introduced egg parasitoid *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae). **Biocontrol**, v. 67, n. 5, p. 473-483, 2022.

BARBOSA, L.R. *et al.* Orientações para a criação massal e liberação em campo de *Cleruchoides noackae* para controle biológico do percevejo bronzeado do eucalipto. **Embrapa Florestas-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**, 2017.

BRASIL. Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. Diário Oficial da União: seção 1, p. 8353, de 15 maio 1996.

CORALLO, B. *et al.* Entomopathogenic fungi naturally infecting the eucalypt bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae), in Uruguay. **Journal of applied entomology**, v. 143, n. 5, p. 542-555, 2019.

DOMINGUES, M. M. *et al.* Selectivity of mycoinsecticides and a pyrethroid to the egg parasitoid *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae). **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 14617, 2020.

JACKSON, M.A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 19, p. 180-187. 1997.

JORDAN, C. *et al.* Entomopathogenic fungi as the microbial frontline against the alien *Eucalyptus* pest *Gonipterus platensis* in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 7233, 2021.

MASCARIN, G.M. *et al.* Natural occurrence of *Zoophthora radicans* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) on *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae), an invasive pest recently found in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, p. 401-404. 2012.

MASCARIN, G. M. *et al.* Advances in submerged liquid fermentation and formulation of entomopathogenic fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 451, 2024.

MOIO, S.G. **Identificação, caracterização e avaliação da patogenicidade dediferentes isolados de *Fusarium* spp.para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae)**. Tese (Doutorado em Agronomia: Proteção de Plantas) – Universidade Estadual de São Paulo. Botucatu, 2015. 59 p.

NADEL, R. L.; NOACK, A. E. Current understanding of the biology of *Thaumastocoris peregrinus* in the quest for a management strategy. **International Journal of Pest Management**, v. 58, n. 3, p. 257-266, 2012.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2025. Disponível em: https://www.R-project.org/. Acesso em: 26 jan. 2026.

SALA, A. *et al.* Current developments in the production of fungal biological control agents by solid-state fermentation using organic solid waste. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 8, p. 655-694, 2019.

SANTOS, T.S. *et al.* Evaluation of isolates of entomopathogenic fungi in the genera *Metarhizium, Beauveria*, and *Isaria*, and their virulence to *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Florida Entomologist**, p. 597-602, 2018.

SOLIMAN, E.P. **Controle biológico de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) com fungos entomopatogênicos**. Tese (Doutorado em Agronomia: Proteção de Plantas) – Universidade Estadual de São Paulo. Botucatu, 2014.

SOLIMAN, E.P. *et al.* Susceptibility of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), a Eucalyptus pest, to entomopathogenic fungi. **Scientia Agricola**, v. 76, p. 255-260, 2019.

TEDESCO, F.G. *et al.* Potential of *Beauveria bassiana* formulations to control *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e969108097-e969108097, 2020.

VELOZO, S.G.M. *et al.* from the dual cyclone harvest performance of single conidium powder to the effect of *Metarhizium anisopliae* on the management of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **PloS one**, v. 18, n. 3, p. e0283543, 2023.

WILCKEN, C.F. *et al.* Chemical vs entomopathogenic control of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) via aerial application in eucalyptus plantations. **Scientific Reports**, v.9, n.1, p. 9416, 2019.

WILCKEN, C.F. *et al.* Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, n.2, 2010.

WILCKEN, C.F. *et al.* Percevejo-bronzeado-do-eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé. In: VILELA, E. F.; ZUCCHI, R. A.. **Pragas Introduzidas no Brasil: insetos e ácaros**. Piracicaba: FEALQ, 2015. 908 p.

WRAIGHT, S.; INGLIS, D. G.; GOETTEL, M. S. Fungi. In: LACEY, L. A.; KAYA, H. K. **Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**, Springer, 223-248p., 2007.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os isolados da coleção do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais testados demonstraram expressivo potencial para serem utilizados como ingredientes ativos em biopesticidas comerciais. A elevada capacidade de produção em meio sólido (arroz), aliada à excelente adaptação ao cultivo líquido submerso, torna essas cepas altamente atrativas para o escalonamento industrial. Destaca-se que a utilização de subprodutos agroindustriais, como o Refinazil® (resíduo de milho) e o melaço de cana-de-açúcar, provou ser uma estratégia sustentável e eficiente para otimizar o rendimento de propágulos utilizando fontes nutricionais de baixo custo, atendendo às exigências da indústria por formulações biológicas consistentes e viáveis.

Apesar da existência de produtos comerciais registrados à base de fungos entomopatogênicos para o controle de *Spodoptera frugiperda*, como os que utilizam *Metarhizium rileyi* (AGROFIT, 2025), a adoção desses bioinsumos em larga escala ainda não acompanha a crescente demanda por práticas agrícolas mais sustentáveis. Tal discrepância ressalta os desafios contínuos relacionados à formulação, estabilidade em prateleira e à aceitação pelo produtor no campo.

A adoção de fungos entomopatogênicos pode desempenhar um papel estratégico no manejo da resistência, especialmente considerando que *S. frugiperda* apresenta alta plasticidade genética e já desenvolveu resistência a diversos inseticidas e às proteínas Cry e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Horikoshi *et al.*, 2016; Omoto *et al.*, 2016). Além disso, esses microrganismos são compatíveis com inimigos naturais, como os parasitoides *Telenomus remus* e *Cleruchoides noackae*, já utilizados no controle da lagarta-do-cartucho e do percevejo-bronzeado, respectivamente (Amaro *et al.*, 2018; Chepkemoi *et al.*, 2024). São, portanto, plenamente integráveis às práticas do Manejo Integrado de Pragas (MIP), favorecendo uma abordagem mais sustentável e resiliente, com potencial ampliado de aplicação em cenários de resistência instalada, tanto em sistemas agrícolas quanto florestais.

Diante desse cenário, torna-se evidente a importância de dar continuidade às pesquisas com novos isolados fúngicos, buscando linhagens com maior

adaptabilidade, eficiência biológica e viabilidade técnica e econômica. A elevada produção observada em meio sólido e líquido nas cepas estudadas reforça o potencial desses fungos como princípios ativos de biodefensivos, atendendo às especificações industriais de rendimento e estabilidade.

Os ensaios de patogenicidade revelaram respostas distintas que direcionam os próximos passos da pesquisa. Os resultados obtidos para *S. frugiperda* indicaram baixa suscetibilidade às linhagens testadas *in vitro*, reforçando a necessidade de prospecção de novas cepas, bem como de estudos voltados a diferentes formulações e táticas de aplicação para esta praga específica.

Em contrapartida, os resultados obtidos contra o percevejo bronzeado (*T. peregrinus*) foram excepcionais. A severa patogenicidade de *M. anisopliae* (LCBPF 31), impulsionada especificamente pela velocidade de ação superior dos blastósporos recém-produzidos no meio líquido otimizado, consolida a viabilidade desta cepa como um poderoso agente de controle. Esses achados não apenas confirmam a eficácia da tática de manejo biológico para essa praga florestal, mas também fornecem uma base técnica e científica robusta para a manufatura em larga escala de micoinseticidas, reforçando a importância do investimento em fermentação líquida para a modernização do controle de pragas.

REFERÊNCIAS

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Disponível: www.agricultura.gov.br. Acesso em: 26 jun. 2025.

AMARO, J. T. *et al.* Selectivity of different biological products to the egg parasitoid Telenomus remus (Hymenoptera: Platygastridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 62, n. 3, p. 195-197, jul./set. 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.rbe.2018.04.003.

BARBOSA, L. R. *et al.* Orientações para a criação massal e liberação em campo de *Cleruchoides noackae* para controle biológico do percevejo bronzeado do eucalipto. **Embrapa Florestas-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**, 2017.

BARBOSA, L. R. *et al.* Percevejo bronzeado do eucalipto: reconhecimento, danos e direcionamentos para o controle. **Embrapa Florestas-Documentos (INFOTECA-E)**, 2012.

BARROS, G.S.C *et al.* Mercado de trabalho do agronegócio brasileiro. **Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA)**, Piracicaba, 2021. Disponível em: < https://cepea.esalq.usp.br/br/mercado-de-trabalho-do-agronegocio.aspx>.

BELCHIOR, D.C.V. *et al.* Impactos de agrotóxicos sobre o meio ambiente e a saúde humana. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 34, n. 1, p. 135-151, 2017.

BOTEGA, C.E. *et al.* Situação atual da produção na agropecuária de forma sustentável. **Sustentabilidade no agronegócio**, p. 21., 2020.

BRASIL. Governo do Brasil. **Vendas externas do agronegócio somam US$ 96,8 bilhões em 2019**. 2020. Disponível em: < https://www.gov.br/pt-br/noticias/agricultura-e-pecuaria/2020/01/vendas-externas-do-agronegocio-somam-us-96-8-bilhoes-em-2019>.

BRASIL. Governo do Brasil. **Vendas externas do agronegócio somam US$ 96,8 bilhões em 2019**. 2020. Disponível em: < https://www.gov.br/pt-br/noticias/agricultura-e-pecuaria/2020/01/vendas-externas-do-agronegocio-somam-us-96-8-bilhoes-em-2019>. Acesso em: 05 mai. 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio 2020/21-2030/31**. 2021 Disponível em: < https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio-2020-2021-a-2030-2031.pdf/view>. Acesso em: 22 mai. 2024.

CARPINTERO, D. L.; DELLAPÉ, P.M.A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae). **Zootaxa**, v. 1228, n. 1, p. 61-68, 2006.

CHEPKEMOI, F. *et al.* Effects of four potent entomopathogenic fungal isolates on the survival and performance of Telenomus remus, an egg parasitoid of fall armyworm. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology,** 2024. DOI: https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1445156.

CROPLIFE. **Produtos biológicos em números.** 2023. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/produtos-biologicos/>.

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 1995. 45 p.

FAO. **Briefing note on FAO actions on fall armyworm.** Roma, Itália, 2019. Disponível em: < https://www.fao.org/3/a-bs183e.pdf. >. Acesso em: 1 out. 2021.

HORIKOSHI, Renato J. *et al.* Effective dominance of resistance of Spodoptera frugiperda to Bt maize and cotton varieties: implications for resistance management. **Scientific reports,** v. 6, n. 1, p. 34864, 2016.

IBÁ – Instituto Brasileiro de árvores. **Relatório Anual (2023)**. Disponível em: <https://iba.org/publicacoes/relatorios>. Acesso em: 22 mai. 2024.

KENIS, M. *et al.* Guide to the classical biological control of insect pests in planted and natural forests. **FAO Forestry Paper**, n. 182, 2019.

LACEY, L. A.; KAYA, H. K. (Ed.). **Field manual of techniques in invertebrate pathology: application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests**. Springer, 2007.

LANDGRAF, L. Controle biológico no Brasil tem potencial de crescer 20% ao ano. **Embrapa soja**. 13 de ago. de 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/45574867/controle-biologico-no-brasil-tem-potencial-de-crescer-20-ao-ano>.

MANTZOUKAS, S.; ELIOPOULOS, P.A. Endophytic entomopathogenic fungi: A valuable biological control tool against plant pests. **Applied Sciences**, v. 10, n. 1, p. 360, 2020.

OMOTO, C. *et al.* **Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by Spodoptera frugiperda in Brazil**. *Pest Management Science*, v. 72, n. 9, p. 1727–1736, 2016. DOI: https://doi.org/10.1002/ps.4201.

RUSSO, M.L. *et al.* Effect of entomopathogenic fungi introduced as corn endophytes on the development, reproduction, and food preference of the invasive fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pest Science**, v. 94, n. 3, p. 859-870, 2021.

SUN, X.X. *et al.* Case study on the first immigration of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* invading into China. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 20, n. 3, p. 664-672, 2021.

WILCKEN, C.F.; BARBOSA, L.R.; SOLIMAN, E.P.; LIMA, A.C.V.; DE SÁ; L.A. N.; LAWSON, S. Percevejo-bronzeado-do-eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé. In: VILELA, E. F.; ZUCCHI, R. A. Pragas Introduzidas no Brasil: insetos e ácaros. Piracicaba: FEALQ, 2015. 908 p.