UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

EFEITO DE INSETICIDAS QUÍMICO E BIOLÓGICOS PARA *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1794) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) E SELETIVIDADE PARA *Trichogramma galloi* ZUCCHI, 1988 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)

Lauany Cavalcante dos Santos

Engenheira Agrônoma

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

EFEITO DE INSETICIDAS QUÍMICO E BIOLÓGICOS PARA *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1794) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) E SELETIVIDADE PARA *Trichogramma galloi* ZUCCHI, 1988 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio De Bortoli

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk

2021

S237e

Santos, Lauany Cavalcante

Efeito de inseticidas químico e biológicos para Diatraea saccharalis (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) e seletividade para Trichogramma galloi Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) / Lauany Cavalcante Santos. -- Jaboticabal, 2021

74 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Sergio Antonio De Bortoli

Coorientador: Ricardo Antônio Polanczyk

1. Entomologia agrícola. 2. Controle biológico. 3. Microorganismos. 4. Macroorganismos. 5. Broca-da-cana. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DE INSETICIDAS QUÍMICO E BIOLÓGICOS PARA *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1794) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) E SELETIVIDADE PARA *Trichogramma galloi* ZUCCHI, 1988 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)

AUTORA: LAUANY CAVALCANTE DOS SANTOS
ORIENTADOR: SERGIO ANTONIO DE BORTOLI
COORIENTADOR: RICARDO ANTONIO POLANCZYK

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. SERGIO ANTONIO DE BORTOLI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola (Fitossanidade) / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Dr. SILVIO ROGÉRIO VIEL (Participação Virtual)
COPLACANA / Piracicaba/SP

Prof. Dr. ARLINDO LEAL BOIÇA JUNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 01 de abril de 2021

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LAUANY CAVALCANTE DOS SANTOS - Nascida em 01 de Dezembro de 1993, na cidade de Serrana, São Paulo, Brasil. É Engenheira Agrônoma graduada pela Faculdade Dr. Francisco Maeda, Campus FAFRAM, com outorga de grau em 07 de Julho de 2017. As atividades de pesquisa em entomologia iniciaram-se no ano de 2015 no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, onde, com a orientação do Prof. Dr. Sergio Antonio De Bortoli, desenvolveu seu primeiro trabalho de iniciação científica na área de Controle de Qualidade do parasitismo de *Cotesia flavipes* no hospedeiro *Diatraea saccharalis*. Durante o ano de 2017 e início de 2018, foi membro da equipe da Ourofino Agrociência atuando na área de Pesquisas em Entomologia. Em agosto de 2018, ingressou no Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, onde, sob orientação do Prof. Dr. Sergio Antonio De Bortoli e coorientação do Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk fez seu trabalho de dissertação na linha de pesquisa de Biologia e Criação de Insetos e Controle Microbiano de Artrópodes Praga, sendo bolsista fomentada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Aos meus pais **Raimundo Cardoso dos Santos** e **Lindalva Cavalcante dos Santos**, por em nenhum momento deixarem de me apoiar na escolha de seguir na Pesquisa e, além disso, darem esse apoio com todo amor e carinho.

Dedico

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus familiares e pessoas que deram aporte para a sua realização e que contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal.

Principalmente aos meus pais, Lindalva Cavalcante dos Santos e Raimundo Cardoso dos Santos, pelo amor inigualável, carinho, auxílio e dedicação. Aos meus avôs, Vô Cassimiro Cardoso dos Santos, Vó Dalvina Pereira dos Santos, Vô José Tenório Cavalcante (in memoriam) e Vó Antônia Cavalcante, pela preocupação, orações e carinho.

Aos meus irmãos Rauan Cavalcante dos Santos e Laysa Cavalcante dos Santos, pela motivação e momentos em família.

À Maria Clara, Alice Barbosa e Maria Isabela Rodrigues dos Santos, minhas afilhadas amadas, pelos momentos de alegria e prazer que vivo com vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela força e pela benção que é viver, minha gratidão eterna por todas as oportunidades e caminhos que Ele me proporcionou trilhar até o dia de hoje. Eu o Amo meu Deus!

À minha família meu pai Raimundo Cardoso dos Santos e mãe Lindalva Cavalcante dos Santos e meus irmãos Laysa Cavalcante dos Santos e Rauan Cavalcante dos Santos;

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Jaboticabal, São Paulo, e também aos Docentes do Programa de Pós-graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) desta instituição, em especial ao Prof. Dr. Sergio Antonio De Bortoli, por todo conhecimento nesses anos de orientação e grandes ensinamentos;

Aos docentes do programa, ao qual homenageio pelo nome do meu Coorientador Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk, pela orientação e parceria durante esse tempo, e por me fornecer conhecimentos das diferentes áreas da entomologia com qualidade e dedicação;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida;

Aos companheiros do Laboratório de Biologia e Criação de Insetos – LBCI, FCAV-UNESP, Aimée Regali Seleghim, Dagmara Gomes Ramalho, Matheus Moreira Dantas Pinto, Caio César Truzi, Gilmar da Silva Nunes, Natalia Fernanda Vieira, Paula Sayuri Taguti, Iwlianny Luiza Pereira dos Santos e Joice Mendonça de Souza, por todos os bons momentos de conversas, lazer e descontração compartilhados fora e dentro do ambiente laboratorial;

Em especial à Dagmara Gomes Ramalho, Gilmar da Silva Nunes, Nathália Alves dos Santos e Paula Sayuri Taguti pela grande amizade construída e grande ajuda com este trabalho e divisões de tarefas com as criações do LBCI;

À Dra. Dagmara Gomes Ramalho pela orientação, compreensão e forte amizade durante toda trajetória deste trabalho;

Às colegas da Biofábrica que forneceu material e apoio técnico para a realização deste trabalho no nome de seus colaboradores: Aimée Regali Seleghim, Josy

AGRADECIMENTOS

Aparecida dos Santos Costa, Cheila Carina Martin e Samanta Regina dos Santos de Luccio que auxiliaram fortemente durante toda a execução desta pesquisa, principalmente pelo envio de material biológico para o estudo;

Aos docentes e colegas que com tamanho carinho participaram de minha banca e contribuirão com a melhoria deste Trabalho Professor Arlindo Leal Boiça Junior e Silvio Rogério Viel;

E a todos os amigos, professores e companheiros que de uma forma ou de outra contribuíram com esse trabalho e fizeram parte de minha vida durante essa etapa.

SUMÁRIO

RESUMO.....15

ABSTRACT…….....17

1. INTRODUÇÃO..... 1

2. REVISÃO DE LITERATURA 5

2.1 A cultura da cana-de-açúcar 5

2.1.1 Histórico 5

2.2 A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* 7

2.2.1 Prejuízos e danos de *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar.....8

2.2.2 Controle de *Diatraea saccharalis* 9

2.3 Aspectos gerais do gênero Trichogramma e de *Trichogramma galloi*.....12

2.3.1 Seletividade de inseticidas à Trichogramma spp. 13

2.4 O controle microbiano por fungos entomopatogênicos 15

2.4.1 Importância do controle de qualidade na produção de bioinseticidas a base de fungos.....16

3. MATERIAL E MÉTODOS 18

3.1 Insetos.....18

3.2 Criação de *Trichogramma galloi*.....18

3.3 Produtos utilizados 19

3.4 Determinação da qualidade dos fungos entomopatogênicos.....20

3.5 Eficácia de misturas inseticidas no controle de *Diatraea saccharalis*.....21

3.6 Parâmetros biológicos de *Diatraea saccharalis* com ovos submetidos aos diferentes tratamentos.....22

3.7 Efeito transgeracional dos tratamentos em *Trichogramma galloi* aplicados em ovos de *Diatraea saccharalis*.....23

3.8 Parâmetros biológicos de *Diatraea saccharalis* com lagartas submetidas aos diferentes tratamentos.....24

3.9 Efeito transgeracional dos tratamentos em *Trichogramma galloi* aplicados em lagartas de *Diatraea saccharalis*.....25

3.10 Análise dos dados.....26

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....27

4.1 Determinação da qualidade dos fungos entomopatogênicos.....27

4.2 Eficácia das misturas para controle de *Diatraea saccharalis*.....27

4.3 Parâmetros biológicos de *Diatraea saccharalis* com ovos expostos aos diferentes tratamentos.....33

4.4 Efeito transgeracional em *Trichogramma galloi* com ovos hospedeiros expostos aos diferentes tratamentos.....37

4.5 Parâmetros biológicos de *Diatraea saccharalis* com lagartas expostas aos diferentes tratamentos.....40

4.6 Efeito transgeracional em *Trichogramma galloi* com lagartas expostas aos diferentes tratamentos.....45

5. CONCLUSÃO.....49

6. REFERÊNCIAS.....50

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 1 - Tratamentos e doses dos produtos empregados nos bioensaios.....20

TABELA 2 - Concentração e germinação dos fungos entomopatogênicos utilizados nos bioensaios.....27

TABELA 3 - Viabilidade e período larval de *Diatraea saccharalis* com ovos expostos aos diferentes tratamentos.....33

TABELA 4 - Período e viabilidade pupal de *Diatraea saccharalis* com ovos expostos aos diferentes tratamentos.....34

TABELA 5 - Peso de pupas, longevidade de machos e longevidade de fêmeas de *Diatraea saccharalis* com ovos expostos aos diferentes tratamentos.....35

TABELA 6 - Razão sexual e número de ovos por fêmea de *Diatraea saccharalis* com exposição de ovos aos diferentes tratamentos.....36

TABELA 7 - Número de ovos parasitados e porcentagem de parasitismo por *Trichogramma galloi* quando os ovos hospedeiros foram expostos aos diferentes tratamentos.....38

TABELA 8 - Porcentagem de emergência e período de ovo a adulto de *Trichogramma galloi,* quando os ovos hospedeiros foram expostos aos diferentes tratamentos.....39

TABELA 9 - Longevidade de *Trichogramma galloi* e número de descendentes (F_1) com ovos dos hospedeiros expostos aos diferentes tratamentos.....40

TABELA 10 - Período e viabilidade larval de *Diatraea saccharalis* com lagartas expostas aos diferentes tratamentos.....41

TABELA 11 - Período e viabilidade pupal de *Diatraea saccharalis* com lagartas expostas aos diferentes tratamentos.....42

TABELA 12 - Peso de pupas, longevidade de machos e longevidade de fêmeas de *Diatraea saccharalis* obtidos com lagartas expostas aos diferentes tratamentos.....43

TABELA 13 - Razão sexual e número de ovos de *Diatraea saccharalis* obtidos com lagartas expostas aos diferentes tratamentos.....44

TABELA 14 - Número de ovos de *Diatraea saccharalis* parasitados e porcentagem de parasitismo de *Trichogramma galloi* quando as lagartas hospedeiras foram tratadas 45

TABELA 15 - Porcentagem de emergência e período de ovo a adulto de *Trichogramma galloi* quando as lagartas hospedeiras foram tratadas.....46

TABELA 16 - Longevidade de *Trichogramma galloi* e número de descendentes em (F_1) quando as lagartas hospedeiras foram tratadas.....48

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1 - Crescimento de colônias dos microrganismos nas misturas. 1) Altacor®, 2) de *Ma* Arroz 3) de *Bb* Arroz, 4) Granada® e 5) Opala® 28

FIGURA 2 - Porcentagem de mortalidade de *Diatraea saccharalis* tratada com misturas entre espécies de fungos e Altacor®. A (*Ma* Arroz), B (*Bb* Arroz), C (Opala®), D (Granada®) e E (Altacor®) - Misturas de caldas; F (*Ma* Arroz), G (*Bb* Arroz), H (Opala®), I (Granada®) e J (Altacor®) - Crescimento em placa (Colônias) 32

RESUMO

EFEITO DE INSETICIDAS QUÍMICO E BIOLÓGICOS EM *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1794) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) E SELETIVIDADE PARA *Trichogramma galloi* ZUCCHI, 1988 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)

Diatraea saccharalis é a espécie de maior importância para a cana-de-açúcar no Brasil, causando elevados danos nos canaviais brasileiros. Devido aos prejuizos se faz necessário o controle desta praga brocadora e dentre os métodos de controle, tem-se: Controle químico e biológico como fortes aliados no MIP desta praga. Misturas de ingredientes ativos para controle de pragas podem aumentar (sinergismo), reduzir (antagonismo) ou não afetar (neutralidade) a eficácia dos produtos, normalmente gerando economia nas operações agrícolas, fato que estimula sua adoção. O objetivo deste trabalho foi avaliar, em condições de laboratório, o efeito de bioinseticidas a base de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Bacillus thuringiensis* e do inseticida químico Altacor® (Clorantraniliprole) (e suas combinações), em *D. saccharalis* e em seu parasitoide *Trichogramma galloi*. Foram realizados testes de monitoramento de qualidade dos entomopatógenos, visualizando-se o crescimento de colônias *in vitro* nas misturas dos inseticidas químico e biológicos. Posteriormente, essas colônias e as respectivas misturas foram avaliadas quanto à mortalidade de *D. saccharalis*. As combinações apresentaram, em sua totalidade, crescimento dos fungos em placa, sendo que a mortalidade de *D. saccharalis* em função dos tratamentos, verificando-se que as formulações comerciais de *M. anisopliae* e *B. bassiana* + clorantraniliprole, embora não tenham provocado inibição na relação de crescimento de colônia, mostraram perdas ou diminuição de eficiência. Os efeitos subletais dos tratamentos foram avaliados em duas análises de parâmetros biológicos de *D. saccharalis* e quanto ao efeito residual em seu parasitoide de ovos *T. galloi*. Dentre os resultados encontrados, verificou-se que *B. thuringiensis* diminuiu o período larval e o número de descendentes em concentrações subletais, enquanto Clorantraniliprole resultou em diminuição do peso de pupas e também no número de descendentes por fêmea em ambas as análises sob efeito subletal na contaminação de ovos e lagartas, com seu efeito sistêmico garantindo um residual que, mesmo a 1% da sua dose, poderia causar mortalidade devido a continuidade de alimentação das lagartas neonatas em colmos onde ocorre resíduo do produto. Os resultados da

seletividade mostram que a porcentagem de emergência e número de descendentes foram afetados pelo tratamento de ovos e de lagartas com *B. thuringiensis* e Clorantraniliprole. Assim, pelos resultados deste trabalho pode-se dizer que esses inseticidas resultam em prejuízo na performance de *T. galloi*.

Palavras-chave: controle biológico, parasitoides, cana-de-açúcar, controle de qualidade.

ABSTRACT

EFFECT OF CHEMICAL AND BIOLOGICAL INSECTICIDES IN *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1794) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) AND SELECTIVITY FOR *Trichogramma galloi* ZUCCHI, 1988 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)

Diatraea saccharalis is the most important pest of sugarcane in Brazil, this insect causes high levels of damage in Brazilian sugarcane crops. Due to the damages, it is necessary to control this pest and among the control methods there is the chemical and biological control as strong tools for the sugarcane borer management. Mixtures of active ingredients for pest control can increase (synergism) or reduce (antagonism) or not affect (neutrality) the effectiveness of the products, usually generating saving in agricultural operations, a fact that encourages their adoption. The objective of this work was to evaluate, under laboratory conditions, the effect of biopesticides based on *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Bacillus thuringiensis* and the chemical pesticide Altacor® (Chlorantraniliprol) (and your combinations), on *D. saccharalis* and its parasitoid on its eggs *Trichogramma galloi*. Quality monitoring tests of entomopathogens were performed, then visualized the growth of colonies in vitro in mixtures of chemical and biological insecticides. Subsequently, these colonies and the same mixtures of biological and chemical insecticides were used to evaluate the effect on *D. saccharalis* mortality. The combinations showed in their totality growth of the plastic petri dish fungi; being that the mortality of *D. saccharalis* as a function of the treatments, verifying that the commercial formulations of *M. anisopliae* and *B. bassiana* + chlorantraniliprol, although they did not cause inhibition in the colony growth relationship, reduction or decrease in efficiency. The sublethal effects of the treatments were evaluated two analyses of biological parameters of *D. saccharalis* and residual effect on the parasitoid of *T. galloi* eggs. Among the results, it was found that *B. thuringiensis* reduced the larval period and the number of offspring in sublethal concentrations, Chlorantraniliprol resulted in a reduction in pupae weight and also in the number of offspring per female in both analyses under sublethal effect on contamination of eggs and caterpillars, besides its systemic effect ensure a residual that even at 1% of its dose, could cause mortality due to the continuity of feeding of neonates caterpillars in stalks where there is residue of the product. Thus, from the

results of this work, it can be said that these insecticides result in damage to the performance of *T. galloi*.

Keywords: biological control, parasitoids, sugar cane, quality control.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é líder mundial na produção de cana-de-açúcar, *Saccharum* spp. (Poales: Poaceae), com aproximadamente 8.605 milhões de hectares de área plantada na safra 2019/20. Praticamente toda cana-de-açúcar produzida no mundo é transformada em açúcar ou álcool, sendo a produção brasileira de açúcar na safra 2018/2019 estimada em 34.245,9 milhões de toneladas e a de álcool em 30,41 bilhões de litros. A produção de álcool tem aumentado ano a ano, sendo que o valor estimado na mesma safra é 11,6% maior que o da safra anterior (2017/2018), que atingiu 27,24 bilhões de litros (CONAB, 2016; CONAB, 2019).

Dados divulgados pela UNICA (2018) mostram o Estado de São Paulo como o grande responsável pela produção de cana no país, contribuindo com mais de 361.492,5 milhões de toneladas, ou seja, mais de 50% da produção nacional. Estes números colocam o Estado de São Paulo como o maior produtor de cana do Brasil, movimentando grande parte da economia brasileira dentro do agronegócio.

Em áreas cultivadas com cana-de-açúcar podem ocorrer diversos problemas, como deficit hídrico, baixa fertilidade de solo, infecções por doenças, dentre outros, além da incidência de artrópodes-praga, todos concorrendo para a redução da produtividade agronômica e industrial (Silva et al., 2020).

Pragas como as cigarrinhas do gênero *Mahanarva* (Hemiptera: Cercopidae), o bicudo, *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae), e a broca da cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), têm causado danos econômicos altamente significativos na cultura, requerendo medidas de controle eficazes (Dinardo-Miranda et al., 2008).

Dentre essas medidas destaca-se o controle biológico, sendo que na cana-de-açúcar teve seu início no final dos anos de 1960, com Professor Domingos Gallo na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, com o objetivo principal de desenvolver um programa de controle biológico para pragas da cana-de-açúcar, iniciando naquela época a utilização de dietas artificiais para criação de *D. saccharalis* em laboratório, com a finalidade de produzir os dípteros (Tachinidae) *Lydella minense* (Townsend, 1927) e *Billaea claripalpis* Wulp, 1896, parasitoides larvais, para emprego no controle

biológico aplicado da broca. Posteriormente foi introduzido, por pesquisadores do Planalsucar, o parasitoide de larvas *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae), que acabou se tornando o maior sucesso de controle biológico aplicado no Brasil (Parra, 2014).

A respeito do sucesso do controle biológico, o controle das cigarrinhas na cana-de-açúcar é mais um desses casos de utilização prática, porém pelo uso do controle microbiano com o fungo *Metharrizium anisopliae*. No Estado de Alagoas, no período de 1977 a 1991, foram pulverizados com este fungo aproximadamente 670.000 hectares de cana infestados por *Mahanarva posticata* (Stäl, 1855) (Hemiptera: Cercopidae), o que levou a uma redução de aproximadamente 72% nos índices de infestação da praga (Alves, 1998).

Outra estratégia com o uso de inimigos naturais para controle de *D. saccharalis* é o parasitoide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae), que tem demonstrado ser um ótimo controlador da praga em laboratório e no campo, sendo que Lopes (1988) obteve as melhores taxas de parasitismo liberando de 1,6 a 3,2 parasitoides por ovo de *D. saccharalis*.

A cultura da cana também sofre com ataques de alguns insetos-praga que têm relação direta com o solo em alguma fases de seu desenvolvimento, para os quais também podem ser adotadas estratégias de controle biológico, como por exemplo, fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. O uso desses fungos associa economia e eficiência de controle (Alves., 1998), sendo que o seu emprego nas fases iniciais de desenvolvimento da broca da cana, quando estão expostas às aplicações de defensivos agrícolas, pode resultar em bons índices de controle para *D. saccharalis*.

Além da utilização de parasitoides e fungos entomopatogênicos no manejo da broca-da-cana, inseticidas químicos e bioinseticidas como aqueles a base da bactéria *Bacillus thuringiensis,* em forma de produtos comerciais ou produzidos “on farm” pelos produtores, podem entrar nesse contexto (Gitahy et al., 2007). Em destaque na classe de produtos químicos para o controle da broca da cana-de-açúcar está a molécula Clorantraniliprole, que é um ingrediente ativo do grupo das diamidas registrado recentemente, e bastante utilizado para o controle de uma variedade de insetos-praga,

sendo que, de acordo com Brugger et al. (2010), apresenta relativa seletividade para inimigos naturais.

Entretanto, esses agentes de controle biológico não possuem efeito de choque, ou seja, a mortalidade dos insetos é mais lenta, e são mais eficientes no controle dos ínstares iniciais de desenvolvimento dos insetos (Lacey et al., 2015). Dessa forma, o conhecimento das suas interações com outras medidas de controle, como os inseticidas químicos, pode melhorar o seu uso pelos agricultores, favorecendo os programas de manejo de pragas (Dara, 2019; Subbanna et al., 2019).

As misturas ou combinações de ingredientes ativos utilizadas pelos agricultores, visam basicamente reduzir o custo de produção da atividade agrícola, uma vez que pulverizações individuais representam alto custo operacional (Krause, 2014; Gandini et al., 2020), destacando-se também que existe a expectativa de se aumentar o espectro de ação das aplicações com misturas de tanque (Cloyd, 2011). Em relação à essas misturas de tanque, Queiroz et al. (2008) citam que o resultado pode ser: aditivo, quando a eficiência do produto é igual ou similar àquela que se tem quando aplicado individualmente; sinérgico, quando há aumento na eficiência; e antagônico, quando interfere negativamente.

As associações de produtos nos tanques de aplicação podem aumentar ou diminuir a eficácia no controle de pragas quando, por exemplo, diferentes entomopatógenos são utilizados de forma combinada ou intercalada com inseticidas químicos ou botânicos, podendo resultar em efeitos sinérgicos ou antagônicos (Dara, 2019; Dhanya et al., 2019; Subbanna et al., 2019).

Tendo em vista a importância de estudos sobre os efeitos de fungos e de bactérias entomopatogênicos no controle de *D. saccharalis* em cana-de-açúcar (Parra e Coelho Júnior, 2019) e a tendência do uso de produtos em mistura nos tanques de pulverização (Gazziero, 2015; Gandini et al., 2020), com o concomitante problema das altas infestações de *D. saccharalis* ao longo dos anos, tem se utilizado o controle biológico aplicado, com a necessidade também da intervenção química, interagindo, assim, o controle químico com o biológico aplicado, como ocorre, por exemplo, com o uso de triflumuron em algumas áreas para combater *D. saccharalis* (Mena, 2010).

Nesse sentido, este trabalho foi realizado objetivando avaliar, em condições de laboratório, o efeito de bioinseticidas a base de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *B. thuringiensis* e do inseticida químico Altacor® (Clorantraniliprole), em *D. saccharalis* e no parasitoide *T. galloi*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da cana-de-açúcar

2.1.1 Histórico

A cana-de- açúcar, *Saccharum officinarum* L. (Poales: Poaceae), é originária da Nova Guiné, sudoeste do Oceano Pacífico, onde era utilizada como planta ornamental. Por volta do século XIV, durante o Renascimento, os senhores feudais portugueses cobravam altos tributos do comércio realizado via marítima, dada a posição geográfica de Portugal que era rota para as navegações carregadas de mercadorias, o que favoreceu a chegada da cana-de-açúcar na Ilha da Madeira, de onde saíram as primeiras mudas para cultivo nas colônias portuguesas (Miranda, 2008).

As primeiras mudas de cana-planta foram trazidas ao Brasil por volta de 1530, da Ilha da Madeira, por Martim Afonso de Souza, para a chamada Capitania de São Vicente (São Paulo), com as capitanias (Capitanias Hereditárias) correspondendo a repartições de terras do Brasil colonial que objetivavam o aumento da produção de açúcar para abastecer não somente o mercado interno, mas também a demanda do mercado Europeu. Este comércio teve rápida expansão territorial e em 1580 o Brasil conquistava o posto de maior produtor de açúcar de cana do mundo (Figueiredo et al., 2008).

Durante o império de D. Pedro II, novas tecnologias foram implementadas, e em 1857 houve a criação do primeiro programa de modernização para a produção de açúcar, o que incentivou a criação de novas indústrias no Nordeste e em São Paulo, e que foram nominadas de "usinas de açúcar" (Natale Netto, 2007)

O Decreto Lei 19.717 de 20 de janeiro de 1931, elaborado por Getúlio Vargas, que objetivou adicionar 5% de álcool a toda gasolina importada, e os avanços tecnológicos deram início à produção e comercialização do etanol no Brasil (Natale Netto, 2007).

O Brasil foi o primeiro país a utilizar bioetanol em grandes volumes, ainda na década de 1970, para fazer frente à crise do petróleo, sendo então criado o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) com o objetivo de incentivar a produção e utilização do álcool como combustível em substituição à gasolina, sendo que o desenvolvimento de veículos movidos a etanol inseriu o biocombustível definitivamente na matriz

energética brasileira, garantindo sua demanda. Esse programa avançou e incentivou a produção em novas regiões do Brasil, como o Paraná, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, onde até então não havia o cultivo da cana e, com isso, em menos de cinco anos a produção de álcool aumentou em 30 vezes, fazendo do Proálcool o maior programa de energia renovável já estabelecido no mundo (Andrade et al., 2009; Machado, 2014; Grassi e Pereira, 2019).

Para aumentar a produção de etanol, uma nova variedade de cana foi desenvolvida, a cana-de-energia, com potencial para triplicar a produtividade da biomassa por hectare e reduzir os custos de produção. Como a maior parte do açúcar produzido pela cana-de-energia é insolúvel, usinas de segunda geração foram instaladas no Brasil e hoje a tecnologia está em fase de consolidação. Buscando aumento na utilização da nova tecnologia dos biocombustíveis, foi criado um novo programa (RenovaBio), visando alavancar o setor sucroenergético, sendo o objetivo básico desse programa impulsionar o desenvolvimento de biocombustíveis, fornecendo aos produtores títulos financeiros, os CBIOs, na proporção do volume e da eficiência da produção do biocombustível, com a condição de respeito à legislação ambiental (Grassi e Pereira, 2019).

O Brasil é líder mundial no cultivo e produção de cana-de-açúcar, com 8,38 milhões de hectares de área a ser colhida na safra 2019/2020, sendo para o mesmo período estimado a produção 615,98 milhões de toneladas de cana, com a produção de etanol projetada em 58,8 bilhões de litros, com 50 bilhões destinados ao mercado interno e 8,8 bilhões às exportações (CONAB, 2019).

A cultura tem se destacado pelos benefícios que proporciona através da energia renovável e pela grande contribuição econômica, particularmente pelo açúcar produzido. Porém, existe uma tendência de diminuição no mercado mundial de açúcar, devido à certos movimentos que trabalham a ideia de que o “açúcar branco” é pouco saudável ao ser humano.

Os principais produtos da cana-de-açúcar são o açúcar branco e o etanol, porém hoje há outros produtos que derivam desta mesma matéria-prima como: outros tipos de açúcares (glicose, frutose, sorbitol e sucralose, além dos açúcares brutos mascavo e demerara); acetonas; antibióticos (penicilina e tetraciclina); enzimas industriais

(amilases e proteases); vitaminas (C, B2 e B12); aminoácidos (lisina e fenilalanina); insumos biológicos para a agricultura (bioinseticidas e fertilizantes); álcool hidratado carburante; álcool anidro; além de derivados do álcool (desidratados e desidrogenados) (Waack et al., 1998). Outro importante subproduto da cana é o “bagaço”, utilizado nas caldeiras de indústrias citrícolas, de papel e celulose, para geração de energia, além de produzir a pasta de celulose para produção de papel, que também pode ser usada na alimentação animal (UNICA, 2009).

Ainda, como já mencionado, a recém desenvolvida cana-de-energia, pode potencialmente triplicar a produtividade da biomassa por hectare e reduzir os custos de produção, pelo desenvolvimento de biocombustíveis, o que pode fornecer aos produtores títulos financeiros, os CBIOs, na proporção do volume e da eficiência da produção do biocombustível (Grassi e Pereira, 2019).

2.2 A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*

Diatraea saccharalis é a espécie de maior importância para a cana-de-açúcar no Brasil, devido à frequência em que causa elevados danos econômicos nos canaviais brasileiros. Sua alta relevância como praga está relacionada a alguns fatores, destacando-se seu alto potencial biótico, boa adaptação ao clima o que proporciona rápido desenvolvimento em campo, e a seu hábito de formar galerias internas nos colmos, reduzindo, além produção, a qualidade agrícola e industrial do produto colhido (Pinto et al., 2006).

Associado a isso a broca tem vários hospedeiros, sendo capaz de infestar diversas culturas, como as gramíneas, milho, sorgo e arroz, o que favorece o aumento de sua população em áreas canavieiras (Benedini, 2006).

O desenvolvimento da broca da cana se dá por holometabolia, tendo em seu ciclo biológico os estágios de ovo, larva (lagarta), pupa e adulto, caracterizando a metamorfose completa. As posturas são geralmente encontradas nas folhas verdes, tanto na parte abaxial quanto adaxial, bem como nas bainhas das mesmas. Os ovos são postos agrupados e de forma imbricada, semelhante a “couro de cobra” ou “escamas de peixe”, com os ovos por postura variando normalmente de 10 a 50, tendo eles formato ovalado e achatado, sendo que no início do desenvolvimento embrionário

são amarelo claros, tornando-se marrom escuros, quando são visíveis as cápsulas cefálicas dos embriões (Micheletti, 1987; Lopes, 1988; Almeida e Arrigoni, 1994; Botelho et al., 1995a e b; Botelho e Macedo, 2002; Gallo et al., 2002).

As lagartas neonatas são de coloração branca-leitosa, com pequenas manchas marrons em formato de linhas seguindo o dorso; apresentam três pares de pernas torácicas e um par de falsas pernas anais. Normalmente passam por seis ínstares de desenvolvimento e podem medir no final da fase larval aproximadamente 25 mm de comprimento. Seu desenvolvimento larval completo leva cerca de 40 dias, a maior parte dele no interior do colmo. No final do seu desenvolvimento a lagarta faz um orifício para o exterior para que o adulto possa sair ao final da fase pupal, fase esta que também ocorre no interior do colmo (Mendonça et al., 1996; Dinardo-Miranda et al., 2008).

A pupa inicialmente é de coloração marrom-clara, escurecendo ao longo de seu desenvolvimento, sendo aquelas que vão originar fêmeas normalmente maiores. Este estágio do ciclo biológico do inseto dura entre 9 e 14 dias, após o qual emerge o adulto (Botelho e Macedo, 2002; Pinto et al., 2006).

Os adultos são mariposas de coloração amarelo-palha com manchas escuras nas asas anteriores e asas posteriores esbranquiçadas, medindo, em média, 25 mm de envergadura. A fêmea geralmente é maior que o macho, com abdômen mais volumoso e asas menos pigmentadas, diferenciando-se o macho por possuir cerdas no último par de pernas (Mendonça et al., 1996; Botelho e Macedo, 2002; Dinardo-Miranda et al., 2008).

Os adultos vivem em média cinco a sete dias, podendo as fêmeas depositar de 200 a 600 ovos, com a capacidade de postura variando com a época do ano, especialmente em função da temperatura; o ciclo biológico se completa em 50 a 60 dias, podendo produzir quatro gerações anuais, dependendo das condições abióticas, particularmente da temperatura (Dinardo-Miranda, 2008).

2.2.1 Prejuízos e danos de *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar

Os danos causados por *D. saccharalis* em cana podem ser diretos, devido ao consumo alimentar das lagartas nos colmos, o que resulta em perda de peso, e

indiretos, com as galerias abertas nos colmos servindo de porta de entrada para microrganismos oportunistas, os fungos causadores da podridão vermelha do colmo (*Colletotrichum falcatum* Went e *Fusarium moniliforme* Sheld.), o que resulta na "inversão de sacarose" prejudicando o processo produtivo industrial.

Devido às galerias abertas pelas lagartas, pode ocorrer quebra de caules pela ação de chuvas e ventos. O ataque em plantas mais jovens produz o sintoma conhecido por "coração morto", que se caracteriza pela morte da folha central causada pela destruição do meristema apical (Botelho e Macedo, 2002; Gallo et al., 2002; Dinardo-Miranda et al., 2008).

O dano causado por *D. saccharalis* é mensurado por meio da avaliação da injúria provocada no colmo pela lagarta, sendo expresso pelo índice de intensidade de infestação da broca (Pinto et al., 2006).

2.2.2 Controle de *Diatraea saccharalis*

A primeira ação a ser tomada em qualquer programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP) é a realização de uma boa amostragem, que demonstrará se realmente se faz necessário o controle. Para fazer o levantamento do dano de brocas em um canavial normalmente se faz a estimativa da infestação, coletando-se colmos e abrindo-os para constatação da presença de galerias construídas pelas lagartas. Nessa coleta de colmos será possível identificar áreas com maiores índices de dano e que necessitam de maior atenção no manejo do inseto, facilitando, inclusive, as tomadas de decisão para próxima safra (Gallo et al., 2002; Pinto et al., 2006).

O controle da broca seria muito facilitado se o hábito da praga fosse diferente, porém, com o seu comportamento alimentar de broquear o interior do colmo, o que limita a utilização de inseticidas, podendo-se ter boa eficiência apenas com aqueles que têm capacidade de se translocarem na planta, os inseticidas sistêmicos.

Há concomitantemente a opção de manejar este controle no início do ciclo das lagartas, quando elas estão fora do colmo, "raspando" as folhas de cana, porém nessa estratégia ainda há uma preocupação da aplicação de inseticidas ocasionar efeitos indesejáveis aos inimigos naturais que auxiliam no controle da *D. saccharalis*, bem como de outras pragas que podem ocorrer na cultura. Já, no contexto do controle

biológico, há naturalmente muitos inimigos naturais trabalhando para a redução da população de *D. saccharalis* na cultura da cana, destacando-se a ação de muitos predadores, parasitoides e de microrganismos entomopatogênicos (Nava et al., 2009).

A predação de lagartas da broca pode ocorrer por insetos como formigas, tesourinhas, entre outros predadores, o que ajuda bastanta na manutenção da população da praga em níveis mais baixos (Volpe, 2014). Quanto aos entomopatógenos, o número de produtos registrados para o controle de *D. saccharalis* em cana vem crescendo ano após ano com bioinseticidas como Dipel® PM e outros a base de fungos entomopatogênicos sendo fortemente utilizados na agricultura brasileira, inclusive em cana-de-açúcar (Agrofit, 2021).

Os bioinseticidas microbianos têm papel central no mercado de controle biológico no mundo (Mora et al., 2017; Marrone, 2019), sendo que no Brasil 80% desses produtos registrados são a base de fungos entomopatogênicos, a maior parte deles com *M. anisopliae* e *B. bassiana* (Mascarin et al., 2019). O aumento da importância destes fungos no manejo integrado de pragas (MIP) deve-se a eficiência no controle, baixa poluição e toxicidade aos organismos não alvo, em relação aos inseticidas químicos de amplo espectro de ação (Lacey et al., 2015; Nicolopoulou-Stamati et al., 2016).

O controle biológico é mais uma tática a ser utilizada no MIP, uma vez que este método minimiza o prejuízo ao ambiente ao utilizar agentes de controle que são de ocorrência natural, com métodos de liberações massais que visam maior eficiência na redução das populações de pragas, destacando-se organismos dos grupos dos predadores, parasitoides e microrganismos entomopatogênicos (fungos, bactérias e vírus).

Os predadores, como algumas espécies de insetos e ácaros, possuem alta capacidade de busca por presas, sendo geralmente generalistas, podendo inclusive predar a própria espécie, limitando com isso sua utilização. Os parasitoides, geralmente, são específicos, podendo ser trabalhados conjuntamente com outros agentes ou técnica de controle, o que pode favorecer a eficiência final no combate às pragas (Alves et al., 1985; Mendonça et al., 1996; Parra et al., 2002; Nava et al., 2009; Parra, 2014).

Para o caso de *D.* saccharalis, o uso de parasitoides ainda é o destaque, visto que esses agentes são eficientes na busca de indivíduos em campo e são produzidos com relativa facilidade em laboratório e com baixo custo. Entre os parasitoides destacam-se: *T. galloi*, para o controle de ovos de *D. saccharalis* (Parra, 1992; Dinardo-Miranda et al., 2008; Nava et al., 2009), e *C. flavipes*, visando o controle das lagartas da broca, destacando-se ser a espécie produzida e utilizada em praticamente todo o território nacional, com ambas as espécies concorrendo significativamente para a redução da porcentagem de infestação da broca e com alta eficiência (Dinardo-Miranda et al., 2014).

Outra modalidade do controle biológico é o microbiano, bastante utilizado na cana-de-açúcar por meio dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, com os mesmos sendo empregados no controle de inúmeras pragas agrícolas de grande importância, como por exemplo *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), *Alabama argillacea* (Hübner, 1823) (Lepidoptera: Erebidae) e *D. saccharalis* (Zappelini et al., 2010).

Dentre os primeiros trabalhos que avaliaram o uso de *B. thuringiensis* variedade *kurstaki* para controle de *D. saccharalis* encontra-se o de Bohorova et al. (1996), onde os autores citam também mais de 400 isolados de *B. thuringiensis* no combate a quatro espécies de praga, sendo que dentre os isolados selecionados para a broca da cana, nenhum apresentou taxa de mortalidade superior a 60%, porém a toxicidade de todos foi maior que o padrão *kurstaki* (HD-1). Deve ser ressaltado que o uso da bactéria *B. thuringiensis* é um caso de sucesso no mundo para o controle de diversas espécies de pragas agrícolas e urbanas há mais de cinco décadas, sendo responsável por 90% do faturamento mundial dos bioinseticidas (Polanczyk e Alves, 2003).

Em 2017 foi lançada no Brasil a primeira cana modificada geneticamente, expressando a proteína tóxica *Cry*1ab de *B. thuringiensis*, com o nome comercial “CTC20 Bt”. Esta tecnologia pretende contribuir como mais uma estratégia no controle da broca da cana, uma vez que essa toxina expressada na planta causa mortalidade em lagartas da broca em seus primeiros ínstares larvais (Agência Estado, 2018).

É vasta a gama de produtos químicos, com diferentes ingredientes ativos, que podem ser utilizados para o controle de *D. saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar,

constando no site do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimanto - MAPA cerca de 45 produtos devidamente registrados para tal finalidade (Agrofit, 2021). Um desses agrotóxicos é o Altacor®, que tem como molécula ativa o Clorantraniliprole, com potencial de controle altamente satisfatório para a broca, sendo considerado seletivo para a maior parte dos inimigos naturais (Córdova et al., 2006; Barbee et al., 2010).

Clorantraniliprole entrou no mercado para incrementar as opções do controle químico de pragas pelos inseticidas tradicionais neonicotinoides, piretroides, organofosforados, carbamatos e organoclorados, com comercialização no Brasil desde de 2007 (Fenoll et al., 2015). Esse químico atua no sistema nervoso do inseto, nos moduladores de receptores de rianodina (IRAC, 2018), provocando a liberação irregular dos estoques de cálcio nas células, ocasionando contração irregular de células musculares, paralisação na alimentação, letargia e paralisia, finalizando com a morte do inseto. Estudos relatam que esta molécula é considerada inócua para vários inimigos naturais, o que favorece seu uso em canaviais comerciais (Sattelle et al., 2008; Brugger et al., 2010).

O inseticida Clorantraniliprole, do grupo químico da antranilamida, apresenta modo de ação sistêmico, tendo a capacidade de se translocar na planta permitindo maior período resídual. Outra vantagem é que as diamidas antranílicas têm baixa toxicidade para aves, peixes e mamíferos, não apresentando riscos para a maioria dos organismos não-alvo (Brugger et al., 2010; Trocska et al., 2015; Silva et al., 2020).

2.3 Aspectos gerais do gênero *Trichogramma* e de *Trichogramma galloi*

O gênero Trichogramma, descrito por Westwood em 1833, possui cerca de 210 espécies descritas que são microhimenópteros endoparasitoides de ovos; medem cerca de 0,2 a 1,5 mm, com hábito solitário ou gregário e com capacidade de parasitismo em uma vasta gama de hospedeiros, principalmente da ordem Lepidoptera (Pinto, 1997; Zucchi e Monteiro, 1997; Pinto et al., 2006). Seus ovos medem cerca de 0,1 mm de comprimento, podendo aumentar de 5 a 6 vezes em tamanho quando próximo da eclosão das larvas, que se alimentam da massa vitelina e do embrião do hospedeiro; as larvas são apnêusticas, o que caracteriza a baixa

exigência de oxigênio nesta fase da vida do inseto (De La Torre, 1993; Parra e Zucchi, 1997; Narazaki, 2019).

A quantidade de ínstares larvais é variável com a espécie e com as diferentes fases do desenvolvimento larval, com uma característica marcante que é mudança na coloração devido ao acúmulo de sais de urato, conferindo uma coloração mais escura a medida que o desenvolvimento embrionário avança (Cônsoli et al., 1999).

O tipo de reprodução pode ser por arrenotoquia, que é a mais comum para o gênero e para a maior parte dos himenópteros, onde os ovos fertilizados produzem fêmeas diploides e ovos não-fertilizados machos haploides. É menos comum a telitoquia ou partenogênese completa, que acontece quando ovos fertilizados e não fertilizados produzem fêmeas diploides (Stouthamer et al., 1990).

O ciclo biológico deste inimigo natural é extremamente afetado por fatores abióticos, sendo que a temperatura interfere diretamente nos parâmetros biológicos do inseto, afetando a duração de ovo-adulto, fecundidade, razão sexual, tamanho e morfologia (Russo e Voegele, 1982; Calvin et al., 1984; Narazaki, 2019).

A quantidade de embriões que se desenvolvem em um só ovo do hospedeiro é variável em função da espécie do Trichogramma, do tipo de hospedeiro (espécie, tamanho) e da temperatura em que está exposto, com o ciclo de desenvolvimento se completando em, geralmente, 10 dias à 25 ºC (Bleicher e Parra, 1990; Grenier, 1998).

A longevidade dos adultos também é um parâmetro biológico dependente da espécie de parasitoide e do hospedeiro, bem como de fatores bióticos e abióticos, com Pereira-Barros et al. (2005) encontrando, por exemplo, longevidades médias de fêmeas e de machos de T. galloi de, em média, de 6,36 dias, sendo esses adultos alimentados com mel.

2.3.1 Seletividade de inseticidas à Trichogramma spp.

A seletividade de produtos químicos à parasitoides, predadores e outros insetos benéficos pode ser classificada em dois grupos: ecológica e fisiológica. A seletividade fisiológica ocorre quando o inseticida atua com maior agressividade na praga do que no inimigo natural, enquanto que a ecológica se dá quando os inimigos naturais não

são atingidos pelo produto químico, por encontrarem-se, por exemplo, em local diferente da praga, caracterizando o escape (Foerster, 2002; Narazaki, 2019).

É importante que a seletividade não seja avaliada apenas quanto à letalidade, mas que leve em consideração outros efeitos na biologia dos inimigos naturais, assim como também em sua performance de parasitismo. Há hoje no mercado muitos inseticidas que se classificam como seletivos a inimigos naturais, como os análogos do hormônio juvenil, ecdisteroides e inibidores de crescimento, existindo porém muitos resultados controversos, especialmente em relação aos efeitos subletais que ocorrem nos inimigos naturais (Foerster, 2002). Segundo esse autor, os parâmetros biológicos mais afetados pelos inseticidas em parasitoides do gênero Trichogramma são: fecundidade, fertilidade, razão sexual e a longevidade, além de algumas alterações no comportamento como, por exemplo, prejuízo na capacidade de busca e na mobilidade. A seletividade de *T. galloi* foi estudada por Cônsoli et al. (2001), sendo avaliada a toxicidade de espinosade, tebufenozida, triflumurom e lufenuron, com os resultados mostrando que os efeitos tóxicos destes inseticidas são diferentes de acordo com a idade do parasitoide, podendo afetar parâmetros como a sobrevivência dos imaturos, o tempo de desenvolvimento, a capacidade de parasitismo, a longevidade e até mesmo o desenvolvimento das futuras gerações. Cônsoli et al. (2001) ainda citam que o espinosade foi nocivo para imaturos e adultos de *T. galloi* parasitando hospedeiro *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae); lufenurom e triflumurom interferiram no período de ovo a larva, atrasando a emergência dos parasitoides; com todos os produtos retardando a emergência dos adultos de *T. galloi*.

Isolados de *M. anisopliae* e triflumurom se mostraram inócuos para *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae), uma vez que não afetou a sobrevivência do inimigo natural quando ovos do hospedeiro, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), foram tratados por imersão nas soluções dos produtos. Essa característica tem sido relatada por diversos autores que defendem a utilização dessas estratégias de controle (biológico + químico) em conjunto, afirmando serem elas de extrema importância para o MIP (De La Rosa et al., 2000; Pratissoli et al., 2010; Oliveira et al., 2013).

2.4 O controle microbiano por fungos entomopatogênicos

No Brasil, fungos entomopatógenos para controle de pragas são muito utilizados, sendo que um dos maiores programas de controle microbiano tem como alvo as cigarrinhas *M. posticata* e *Mahanarva fimbriolata* (Stäl, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar, empregando-se *M. anisopliae* que normalmente é encontrado causando epizootias em populações desses insetos (Alves, 1998; Almeida e Batista Filho, 2001).

Os bioinseticidas microbianos têm tido papel central no mercado de controle biológico no mundo (Mora et al., 2017; Marrone, 2019), sendo que no Brasil 80% dos bioinseticidas registrados são a base de fungos, em sua maioria com *M. anisopliae* e *B. bassiana* (Mascarin et al., 2019).

Os fungos são patógenos de largo espectro de ação e capazes de causar doença em insetos fitófagos que vivem na parte aérea das plantas e no solo, bem como em algumas espécies aquáticas, podendo causar epizootias naturais. A capacidade de infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, como ovos, larvas, pupas e adultos, os colocam em patamar muito desejável no controle de pragas agrícolas. Alguns são virulentos e a maioria é altamente especializada na penetração via tegumento, o que os coloca em vantagem quando comparados com outros grupos de patógenos que só atacam o inseto por infecção via oral, como *B. thuringiensis* por exemplo (Alves, 1998; Almeida e Batista Filho, 2001).

A seleção de isolados é a base para a implantação de um programa de controle bem sucedido, representando também uma etapa inerente no processo de desenvolvimento de um bioinseticida. Este procedimento é recomendado principalmente devido à enorme variabilidade genética existente entre os entomopatógenos, o que lhes confere diferentes e importantes características como patogenicidade e virulência a grupos específicos de insetos (Alves, 1998).

São caracteristicas desses bioinseticidas a grande sensibilidade a condições ambientais, como temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta, além das condições nutricionais e da suscetibilidade do hospedeiro infectado, que geralmente ocorre via tegumento com a adesão, germinação e penetração dos conídios por meio

de forças físicas, pelo rompimento do tegumento, e químicas, pela produção de enzimas que provocam a histólise dos tecidos da cutícula. O fungo então ramifica-se colonizando o hospedeiro, desde os corpos gordurosos até o sistema nervoso, o que provoca a morte do inseto devido a produção de micotoxinas e ao esgotamento de nutrientes (Alves, 1998).

Para lagartas de *D. saccharalis*, Zappelini et al. (2010), ao testarem vários isolados de fungos em broca da cana, encontraram diferenças de mortalidade entre os isolados que variaram de 10% a 90%. Da mesma maneira, Alves (1998) e Coutinho (2009) analisaram a capacidade dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* de provocarem doença em *D. saccharalis*, observando que esses fungos ocorrem naturalmente em cerca de 10% das lagartas coletadas no Nordeste brasileiro. São eles patogênicos para todos os estágios de desenvolvimento da broca, atuando com eficiência em ovos com um a dois dias de idade, sendo que Wenzel et al. (2006) constataram *B. bassiana* foi patogênico para lagartas da broca da cana-de-açúcar em todas as concentrações avaliadas, com a mortalidade aumentando em função do tempo e das concentrações.

2.4.1 Importância do controle de qualidade na produção de bioinseticidas a base de fungos.

No Brasil, embora o uso de fungos entomopatogênicos em canaviais venha crescendo anualmente e de forma bastante rápida, a qualidade na produção destes entomopatógenos ainda necessita passar por alguns ajustes. Há no mercado produtos com alta qualidade e suficientes em concentração de conídios, viabilidade, pureza e escolha de cepas com potencial genético favorável para a espécie a ser controlada, porém o contrário também é relatado, o que é resultado da grande quantidade de produtos produzidos e comercializados, mas não registrados. (Alves, 1998; Oliveira, 2009), ou produzidos “on farm”.

Um sistema de produção de entomopatógenos que não possui protocolo de controle de qualidade, não contemplando o devido controle de seus lotes produzidos, das concentrações de agentes ativos e o devido “feedback” dos produtores, tende a gerar produtos com desempenhos variáveis e que deixam a desejar, levando a falhas de

controle em campo e séria perda de confiança na tecnologia pelos usuários (Jenkins e Grzywacz, 2000).

Para a constatação da qualidade dos bioinseticidas a base de fungos entomopatogênicos, algumas ações podem ser tomadas quando do recebimento do produto: 1) monitoramento de contaminações (sanidade) - para esta quantificação é possível a realização de um simples teste de pureza em qualquer fase de produção ou, até mesmo, com uma alíquota final do produto; 2) controle das condições de armazenamento, durante a produção, transporte e manutenção do produto final até a aplicação – atentando-se para a acomodação do produto, sabendo que este não é um químico convencional e que necessita de acondicionamento adequado para a manutenção de sua qualidade; 3) concentração do produto - pode ser feita de preferência no recebimento do produto de forma bem fácil e por laboratórios de análises de microrganismos; 4) agressividade e virulência - simples testes de mortalidade em laboratório podem atestar a virulência dos produtos; 5) quantidade de microorganismos viáveis por grama de produto final - este parâmetro é medido por meio de testes de germinação. Essas ações são recomendadas por Batista Filho et al. (1998) e Jenkins e Grzywacz (2000), sendo que para estes autores a falta de controle de qualidade pelos produtores dos bioinseticidas e da constatação da qualidade pelos consumidores finais são os fatores que vêm limitando o avanço do controle microbiano aplicado utilizando fungos entomopatogênicos.

Deve-se reconhecer que os procedimentos de controle de qualidade podem ser mais complexos e tecnologicamente mais exigentes do que os próprios procedimentos de produção. Porém, a aceitabilidade dos bioinsecticidas a base de fungos a longo prazo é função direta da eficácia desses procedimentos de controle de controle de qualidade. Nesse sentido, o trabalho de Jenkins e Grzywacz (2000) detalha procedimentos considerados necessários na produção massal de fungos e vírus, com qualidade, para uso como agentes de biocontrole, sugerindo padrões razoáveis que podem ser alcançados por todos os produtores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Insetos.

Ovos e lagartas de *D. saccharalis* foram obtidos da Biofábrica da Usina São Martinho, Pradópolis, SP, sendo os bioensaios conduzidos no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos (LBCI) do Departamento de Ciências da Produção Agrícola da FCAV-UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, em sala climatizada com temperatura de 27 ± 1 °C, fotoperíodo diário de 12h luz e 12h escuro e umidade relativa de 70 ± 10%.

3.2 Criação de *Trichogramma galloi.*

A população de *T. galloi* foi mantida em ovos do hospedeiro natural *D. saccharalis* alimentada com dieta artificial adaptada de Hensley e Hammond Jr. (1968) durante toda a condução dos bioensaios.

Posturas do hospedeiro natural *D. saccharalis* com até 24h de idade foram oferecidas, em tubos de ensaio de fundo chato (8,5 cm de comprimento x 2,5 cm de diâmetro), aos parasitoides e na proporção de 1 fêmea:10 ovos, por um período de até 24h. Com auxílio de uma agulha de aplicação de insulina, gotículas de mel foram depositadas nas paredes dos tubos para alimentação dos adultos. Esses tubos foram organizados em grades metálicas de acordo com as respectivas datas de parasitismo e mantidos em sala climatizada também com temperatura de 25 ± 1 °C, fotoperíodo diário de 12L:12E horas e umidade relativa de 70 ± 10%. Diariamente, até o final da emergência dos parasitoides, as posturas parasitadas foram umidecidas afim de que a falta de umidade não comprometer a ruptura dos ovos para a emergência da “vespinhas e retiradas as lagartas eclodidas oriundas dos ovos não parasitados, isso até ao final da emergência dos adultos, recomeçando o ciclo.

3.3 Produtos utilizados

Os fungos entomopatogênicos na formulação em arroz, *M. anisopliae* (Ma Arroz) - isolado IBCB 425, e *B. bassiana* (Bb Arroz) - isolado IBCB 66, foram escolhidos para o trabalho devido ao grande uso em campo no Brasil, sendo obtidos na Biofábrica da Usina São Martinho, Pradópolis, SP, e mantidos no LBCI, em “freezer” a temperatura de -1°C ± 2 °C. Os bioinseticidas a base de fungos entomopatogênicos na formulação PM, Opala® - *M. anisopliae* (Ma PM), isolado IBCB 425, e Granada® - *B. bassiana* (Bb PM), isolado IBCB 66, foram adquiridos em revendedor comercial, também foram mantidos em “freezer” a temperatura de -1°C ± 2 °C. O produto Dipel® PM, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* - linhagem HD-1 (Bt) (com proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa), adquirido em revenda comercial, foi mantido em geladeira a temperatura de 5°C ± 2°C. O inseticida químico Altacor® WG (Clorantraniliprole), adquirido em revendedor comercial, foi mantido em temperatura ambiente.

Os produtos foram diluídos em água deionizada estéril contendo 0,05% v/v de Tween® 20 (Polisorbato), sendo utilizados nas doses recomendadas pelos fabricantes para aplicação no campo (Tabela 1).

Tabela 1. Tratamentos e doses dos produtos empregados nos bioensaios.

Tratamentos	Doses (g/ha – Volume/ha)
Tween® 20 (Polisorbato)	0,05%
Água	-
Controle	-
Altacor® (Clorantraniliprole)	60 g/ha – 200L
Dipel® (*B. thuringiensis*)	1000 g/ha – 150L
Granada® (*B. bassiana*)	500 g/ha – 150L
Opala® (*M. anisopliae*)	750 g/ha – 150L
B. bassiana – Arroz	1000 g/ha – 150L
M. anisopliae – Arroz	1000 g/ha – 150L

3.4 Determinação da qualidade dos fungos entomopatogênicos

Para avaliar a germinação e viabilidade das formulações dos produtos biológicos à base de fungos, os conídios foram suspensos em 10 mL de água destilada esterilizada + espalhante adesivo Tween® 20 (0,05%), na concentração de 107 conídios/mL. Das suspensões foram retiradas alíquotas de 0,1 mL e espalhadas com alça de Drigalsky em cinco lâminas contendo uma fina camada de meio de cultura de Ágar Batata Dextrose (BDA). As lâminas foram mantidas em câmara climatizada do tipo BOD (temperatura de 25 ± 1 ºC, fotoperíodo de 12h L:12h E e UR: 70 ± 10%, por 16 horas), sendo quantificados os conídios germinados após este período, sob microscópio óptico com aumento de 400 vezes (três campos por lâmina) (Francisco et al., 2006). Os dados para análise foram transformados em arcsen raiz (x/100).

3.5 Eficácia de misturas inseticidas no controle de *Diatraea saccharalis*

Os tratamentos foram baseados em misturas dos inseticidas comerciais Altacor®, Dipel®, Opala® e Granada®, além dos comparativos com os dois bioinseticidas produzidos pelo Laboratório de Entomopatógenos da Usina São Martinho, Pradópolis, SP, sendo nominados *M. anisopliae* (Ma Arroz) e *B. bassiana* (Bb Arroz), ambos produzidos e utilizados em esporos em arroz. Neste bioensaio foram preparadas caldas de cada bioinseticida, sendo checada a concentração de conídios e esporos das amostras, e inoculadas em cantos opostos das placas, a fim de se observar inibição (sem crescimento de colônias) entre os microrganismos. As placas inoculadas foram mantidas em câmaras de germinação do tipo BOD à 27 ± 2°C, umidade relativa de 70 ± 10% e fotoperíodo de 12h L:12h E.

Decorridos sete dias da inoculação, os microrganismos que desenvolveram colônias nas placas foram retirados por raspagem no meio de cultura com o auxílio de uma alça de platina e suspendidos em 10 mL de água destilada + Tween® (0,05%) em tubos Falcon®.

As soluções contendo a dose comercial dos inseticidas foram aplicadas sobre o dorso das lagartas no teste de mortalidade, sendo que as lagartas utilizadas neste bioensaio foram mantidas nas mesmas condições das placas inoculadas.

Uma segunda metodologia foi utilizada (teste de contato) para avaliar a eficácia das misturas em lagartas de *D. saccharalis*. Nesses bioensaios foram pipetados 2 μL da calda [10 mL de água deionizada autoclavada + Tween® 20 (0,05%) + calda de bioinseticida/calda de estoque em placa] sobre o dorso das lagartas na região protorácica. Como controles positivos foram utilizados os bioinseticidas *M. anisopliae* – arroz, *B bassiana* – arroz, Opala®, Granada®, Dipel® e Altacor®, acrescidos de Tween® 20 (0,05%) nas caldas. Nos controles negativos, as lagartas foram tratadas com água deionizada (controle 1), com água deionizada + Tween® 20 (0,05%) (controle 2) e nenhuma aplicação (controle 3). Cada tratamento foi composto por 5 repetições contendo 20 lagartas de 2º ínstar por placa, totalizando 100 indivíduos por tratamento.

Após a aplicação, as lagartas foram transferidas para placas de Petri (9,0 cm de diâmetro), sendo alimentadas com dieta artificial, adaptada de Hensley e

Hammond Jr. (1968), e acondicionadas em estufa incubadora tipo BOD, regulada para 27 ± 1 ºC, 70 ± 10% de UR e fotoperíodo de 12h L e 12h E. O número de lagartas mortas foi registrado aos 10 dias após a aplicação, constatado quando as lagartas não se moviam ao serem tocadas com um pincel de cerdas finas.

3.6 Parâmetros biológicos de *Diatraea saccharalis* com ovos submetidos aos diferentes tratamentos

Cada bioinseticida e inseticida foi considerado um tratamento, sendo que a concentração utilizada para os diferentes organismos foi determinada de acordo com a letalidade do tratamento, considerando que o objetivo era o de obter indivíduos sobreviventes para as avaliações de seletividade com o parasitoide na geração F_1, sendo então os tratamentos aplicados em F_0 (geração parental) e avaliados em F_1 do parasitoide. Foram conduzidos testes preliminares com menor quantidade de indivíduos para chegar nas concentrações utilizadas, obtendo-se assim número suficiente de sobreviventes para os testes de seletividade. Massas de ovos de *D. saccharalis* depositadas em papel sulfite durante o período de 24 horas foram recortadas e contadas em microscópio estereoscópico; utilizaram-se cinco massas/repetições contendo aproximandamente 50 ovos cada.

Grupos de cinco massas de ovos foram separadas e colocadas em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, revestidas em sua base com papel de filtro para auxiliar na secagem. Posteriormente, foram mergulhadas em suspensões dos conídios, nas concentrações de 8,2 x 10^6 con.mL^{-1} para *B. bassiana* PM; 7,4 x 10^6 con.mL^{-1} para *B. bassiana* Arroz; 6,1 x 10^6 con.mL-^{1} para *M. anisopliae* PM; 1,3 x 10^6 con.mL-^{1} para *M. anisopliae* Arroz; e suspensão de esporos de 3,2 x 10^6 esp.mL-^{1} para todas as concentrações, o que correspondem a 25% da dose recomendada para aplicação em campo e o tratamento químico Clorantraniliprole na dosagem de 1% (0,006g/1000mL) da dose comercial recomendada para cana-de-açúcar. Utilizou-se 25 massas de ovos para cada tratamento.

Em seguida, as placas foram incubadas em estufa tipo BOD a 25 ± 1 °C, com fotoperíodo diário de 12 horas, até que houvesse a eclosão das larvas neonatas. O grupo testemunha foi pulverizado com o veículo das suspensões, água deionizada

acrescida de Tween® 0,05% e água, enquanto o outro controle não recebeu tratamento algum. Logo após a eclosão, em média no quinto dia pós-aplicação, as larvas neonatas tratadas foram transferidas para placas de Petri contendo um cubo de 2 cm³ de dieta artificial (Hensley e Hammond Jr., 1968).

Foram utilizadas 100 lagartas dos tratamentos controle (sem tratamento, Água e Tween®) e 250 lagartas por tratamento químico e biológico totalizando 1.800 lagartas. As placas foram mantidas em sala climatizada a 27 ± 1 °C, com fotofase diária de 12 horas, até que todas as lagartas atingissem à fase de pupa. As pupas tiveram seus pesos aferidos 24 horas após a mudança de fase e foram separadas em macho ou fêmea, com uso de um microscópio estereoscópico.

Diariamente foi avaliada a emergência de adultos separando-se 20 casais de mesma idade e acondicionando-os em gaiolas feitas com tubos de PVC 85 mm de diâmetro x 110 mm de altura), revestidos internamente com papel sulfite, substrato para oviposição. A base da gaiola consistiu de um fundo de uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro recoberta com papel filtro, enquanto a extremidade superior foi fechada com papel sulfite preso com elástico. Uma placa de Petri de 55 mm de diâmetro contendo algodão umedecido solução de mel 10% (dieta dos adultos) foi colocada interiormente na base da gaiola. O bioensaio foi mantido em sala climatizada a 27 ± 0,5 °C e fotofase diária de 12 horas.

Neste bioensaio foram avaliados: mortalidade, período e a viabilidade pupal, longevidade dos adultos e a fecundidade das fêmeas. As folhas de papel sulfite contendo as posturas foram substituídas diariamente, sendo elas recortadas e acondicionadas em placas de Petri mantidas em sala climatizada (25 ± 1 ºC, 70 ± 10% de umidade relativa e fotofase de 12 horas diária) até a eclosão das lagartas.

3.7 Efeito transgeracional dos tratamentos em *Trichogramma galloi* aplicados em ovos de *Diatraea saccharalis*

Posturas obtidas das populações tratadas na fase inicial dos ovos de *D. saccharalis*, com idade de até 24 horas, foram recolhidas e expostas à fêmeas do *T. galloi* para o parasitismo. Cada tratamento foi repetido 30 vezes (posturas), cada uma delas contendo em média 30 ovos recém postos e uma fêmea do parasitoide com idade de

até 24h. Cada postura e fêmea foi acondicionada em um tubo de ensaio de fundo chato (8,5 cm de altura x 2,5 cm de diâmetro), vedado com filme plástico PVC, ficando expostas ao parasitismo por 24 horas.

Após esse período a fêmea foi retirada e as posturas mantidas em câmara BOD a 25 ± 1 °C e fotofase diária de 12 horas até 5 dias após o parasitismo. Ao observar o enegrecimento dos ovos parasitados, foi inserido no tubo um pequeno pedaço de papel filtro levemente umedecido em água deionizada, sendo os mesmos revisados diariamente quanto a umidade e a remoção de lagartas eclodidas dos ovos não parasitados, até a emergência de todos os adultos do parasitoide. Depois da emergência foram separados 30 indivíduos aleatóriamente das 30 repetições para a determinação da longevidade da prole, com avaliações diárias até a morte dos adultos.

O parasitismo foi avaliado anotando-se o número de ovos enegrecidos em cada postura/repetição e quantificada a média total do tratamento e a porcentagem de emergência por meio da contagem no número de embriões por postura ou repetição/o número de adultos emergidos*100 (Degrande e Gomez, 1990). Foi determinada a porcentagem de emergência por número de adultos/número de ovos parasitados x 100, longevidade, período de ovo-adulto e porcentagem de parasitismo (número de ovos escuros/número de ovos oferecidos x 100).

3.8 Parâmetros biológicos de *Diatraea saccharalis* com lagartas submetidas aos diferentes tratamentos

Grupos de 250 lagartas de segundo ínstar (7 dias da eclosão) receberam uma gotícula de 2 µL na região do dorso das suspensões nas concentrações de 6,2 x 10^6 con.mL^{-1} de *B. bassiana* PM; 7,4 x 10^6 de *B. bassiana* Arroz; 3,7 x 10^6 de *M. anisopliae* PM; e 1,2 x 10^6 de *M. anisopliae* Arroz, além de 4,4 x 10^6 esp.mL-^{1} em todas elas, o que corresponde a 25% das doses recomendadas dos bioinseticidas para aplicação no campo, doses estas acertadas em testes prévios a este ensaio. O tratamento químico com Clorantraniliprole foi utilizado na dosagem de 0,003g/1000mL, o que corresponde a 1% da dose comercial de campo para cana-de-açúcar.

Os controles receberam aplicação de água deionizada, água deionizada estéril + Tween®20 5% e um terceiro sem aplicação alguma, na quantidade de 100 lagartas para cada um, totalizando 300 lagartas. Após o tratamento, as lagartas foram individualizadas em placas de Petri contendo um cubo de 2 cm^3 de dieta artificial. Estas foram mantidas em sala climatizada a 27 ± 1 °C, com fotofase diária de 12 horas e 70 ± 10% de umidade relativa. Avaliou-se o tempo de vida e a mortalidade das lagartas nos tratamentos, sendo as pupas obtidas pesadas 24 horas após a mudança de fase e separadas por sexo. Diariamente foi avaliada a emergência de adultos, sendo que logo após a emergência 20 casais foram transferidos para gaiolas feitas de tubos de PVC de 85 mm de diâmetro x 110 mm de altura, revestidas internamente com papel sulfite (substrato para oviposição). A base da gaiola assentava-se em um fundo de uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro recoberto com papel filtro. A extremidade superior foi fechada com papel sulfite preso com elástico. Uma placa de Petri de 55 mm de diâmetro contendo algodão umedecido em solução de mel a 10% (alimento dos adultos) foi colocada internamente na base da gaiola.

As gaiolas foram mantidas em sala climatizada a 27 ± 0,5 °C e fotofase diária de 12 horas, 70 ± 10% de umidade relativa. As folhas de papel sulfite contendo os ovos eram substituídas diariamente, sendo recortadas e transferidas para placas de Petri contendo em seu interior chumaços de algodão embebidos em água deionizada e mantidas a 25 ± 0,5 °C. Neste bioensaio foram avaliados a mortalidade, o período e a viabilidade pupal, a longevidade dos adultos e a fecundidade das fêmeas.

3.9 Efeito transgeracional dos tratamentos em *Trichogramma galloi* aplicados em lagartas de *Diatraea saccharalis*

Posturas obtidas das populações cujas lagartas foram tratadas no 2º ínstar foram expostas ao parasitismo, sendo cada tratamento constituído de 30 repetições, cada um deles contendo em média 30 ovos e uma fêmea de *T. galloi* de até 24h de idade. Posturas e fêmeas foram acondicionadas em tubos de ensaio de fundo chato (8,5 cm de altura x 2,5 cm de diâmetro), vedados com filme plástico PVC e ficando expostos por 24 horas.

Após esse período, as fêmeas foram retiradas e as posturas foram mantidas em câmara BOD a 25 ± 1 °C e fotofase diária de 12 horas, avaliando-se a partir do quinto dia após o parasitismo o enegrecimento dos ovos, sendo os tubos revisados diariamente, checando-se a umidade, removendo-se as lagartas eclodidas dos ovos não parasitados e acompanhando-se os adultos do parasitoide emergidos. Dos adultos emergidos foram utilizados 30 indivíduos retirados aleatóriamente das repetições onde a emergência foi observada, avaliando-se a longevidade. Determinou-se também a porcentagem de emergência (número de adultos /número de ovos parasitados x 100), período de ovo a adulto e porcentagem de parasitismo (número de ovos escuros/número de ovos oferecidos x 100).

3.10 Análise dos dados

Os bioensaios relativos aos parâmetros da biologia de *D. saccharalis* foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo nove tratamentos e 250 repetições, enquanto nos de seletividade o delineamento também foi em DIC, porém com nove tratamentos e 30 repetições. Os dados foram submetidos aos testes de Kolmogorov e Barttlet, para verificação da normalidade e homogeneidade de variância, respectivamente. Os resultados foram analisados pelo PROC ANOVA, com as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Quando não atenderam aos requisitos da ANOVA foram submetidos a análise não paramétrica, sendo as médias comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis utilizando o (PROC NPARWAY) (SAS Institute, 2015).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da qualidade dos fungos entomopatogênicos

As amostras passaram por dois testes consecutivos e nesses testes de viabilidade e germinação dos conídios, utilizando a metodologia de Francisco et al. (2006), aqueles parâmetros foram sempre maiores que 90%, mostrando, assim, que os fungos estavam aptos para a utilização nos demais bioensaios ensaios (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração e germinação dos fungos entomopatogênicos utilizados nos bioensaios.

Tratamentos	*Bb* Arroz	Granada®	*Bb* Arroz	Granada®
Teste 1 - 27/01/2020				
Concentração	$5,5 \times 10^{6*}$	$5,5 \times 10^{6}$	$4,0 \times 10^{6}$	$4,0 \times 10^{6}$
% germinação	95,67	95,27	96,13	95,47
Tratamentos	*Ma* Arroz	Opala®	*Ma* Arroz	Opala®
Teste 2 - 30/01/2020				
Concentração	$7,7 \times 10^{6*}$	$7,2 \times 10^{6}$	$7,2 \times 10^{6}$	$7,0 \times 10^{7}$
% germinação	98,53	98,93	97,60	97,73

*Valores médios

4.2 Eficácia das misturas para controle de *Diatraea saccharalis*

A germinação e o crescimento das colônias ocorreram em todos os tratamentos, nas combinações de produto químico x biológicos ou entre espécies de fungos, demonstrando que os tratamentos testados são compatíveis (Figura 1).

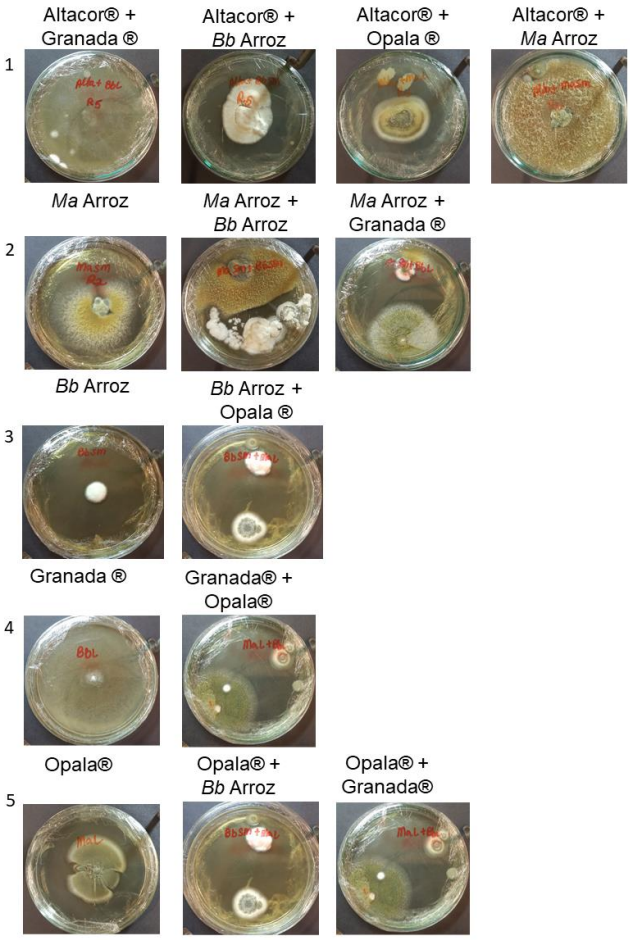

Figura 1. Crescimento das colônias dos microrganismos nas misturas. 1) Altacor®, 2) *Ma* Arroz 3) *Bb* Arroz, 4) Granada® e 5) Opala®.

As diversas relações existentes entre controladores químicos e biológicos apresentam entraves a serem investigados e solucionados, com essas relações se tornando ainda mais complexas quando dizem respeito aos diferentes produtos biológicos agindo conjuntamente. Este trabalho apresenta algumas relações possíveis de ocorrerem no complexo agroecossistema da cana-de-açúcar, tentando elucidar relações chaves que podem concorrer visando a excelência do controle microbiano de pragas nessa cultura.

A mortalidade de lagartas de *D. saccharalis* causada por *Ma* Arroz foi maior do que em mistura com Granada® (*Ma* Arroz + Granada®) com 99,22% de mortalidade ($F_{3,16}$ = 147,08 e P < 0,0001). Nas misturas com *Bb* Arroz, a mortalidade mais alta foi na

associação com o inseticida químico Altacor® (Altacor®+ *Bb* Arroz), superando a marca de 96% (χ^2 = 14,60; df = 3 e P = 0,0022) (Figura 2A e B).

Para os tratamentos com bioinseticidas comerciais, o produto Opala® na mistura com Granada® (Opala® + Granada®) diferiu das demais combinações, alcançando 99,26% de mortalidade (χ^2 = 12,57; df = 3 e *P* = 0,0057). Entre as combinações com Granada®, a associação com Opala® (Granada® + Opala®) e com *Ma* Arroz (Granada® + *Ma* Arroz) provocaram altas mortalidades (99,26% e 99,22%, respectivamente) ($F_{3,16}$ = 276,92; df = 3 e *P* < 0,0001) (Figura 2 C e D).

Em relação às misturas com a presença de Altacor®, a combinação com *Bb* Arroz (Altacor® + *Bb* Arroz) apresentou a maior taxa de mortalidade (96,68%) ($F_{4,20}$ = 128,05; df = 3 e *P* < 0,0001) (Figura 2E).

Quando aplicadas sobre as lagartas, as misturas Altacor® + *Ma* Arroz e Altacor® + *Bb* Arroz apresentaram as maiores porcentagens de mortalidade, 69,41% (χ^2 = 15,53; df = 3, *P* = 0,0014) e 96,68% (χ^2 = 17,94; df = 3 e *P* = 0,0005), respectivamente (Figura 2 F e G).

Nas misturas com o produto Opala® em placa, não houve diferença entre os tratamentos testados; quando a base da mistura foi Granada®, com Altacor® apresentou mortalidade maior que as demais combinações (χ^2 = 6,35; df = 3 e *P* = 0,0957) (Figura 2 H e I).

Altacor® associado com Opala®, reduziu a mortalidade do inseto quando comparado ao produto químico isolado, que causou 100% de mortalidade das lagartas de *D. saccharalis*. De acordo com os resultados de Jia et al. (2016), Clorantraniliprole influenciou na virulência de *M. anisopliae* em *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758) (Orthoptera: Acrididae), produzindo forte interação sinérgica e em algumas doses antagônica, com coeficientes de toxicidade muito altos, que variaram em função das proporções dos dois agentes e do tempo da aplicação, com esses coeficientes sendo utilizados para avaliar o efeito das interações entre fungos entomopatogênicos e inseticidas, de modo que as melhores combinações de doses e tempo de aplicação possam ser determinadas.

Na mistura Altacor® com Opala® houve diminuição de cerca de 90% da mortalidade em relação ao Altacor® em *D. saccharalis*, nas duas situações avaliadas (caldas de

bioinseticidas e crescimento de colônias em placa), com o químico isolado provocando 100% de mortalidade de lagartas ($F_{4,20}$ = 128,05 e P < 0,0001) (χ^2 = 16,99; df = 4 e P = 0,0019) (Figura 2E e 2J).

O efeito da combinação também é observado entre o produto químico com o bioinseticida *Bb* (Altacor® + Granada®), corroborando com estudo semelhante onde imidacloprido aumentou a eficácia de *B. bassiana* no combate a *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring, 1994 (Hemiptera: Aleyrodidae) (James e Elzen, 2001), porém com níveis de controle não superiores do que o observado quando foi utilizado imidacloprido isoladamente, como encontrado neste trabalho com Altacor®, que também isoladamente provocou alta mortalidade de lagartas. O mecanismo pelo qual um patógeno fúngico pode inibir a ação de Clorantraniliprole é incerto, porém leva à importantes questionamentos desta relação.

Outro fator importante envolvendo as misturas de produtos é o ingrediente inerte presente na formulação comercial, tanto de Opala® como de Granada®. A composição exata dos bioinsecticidas comerciais raramente é declarada pelos fabricantes e, em muitos casos, nem mesmo o propágulo específico que compreende o ingrediente ativo é indicado, sendo esses quesitos de formulação considerados segredos de empresa (Faria et al., 2007).

Quando unido o fator de doses e a presença de componentes inertes, pode-se ter uma possível explicação para a diminuição de eficiência do tratamento Altacor® + Opala® e Altacor® + Granada®. Nesse sentido, os bioinseticidas à base dos mesmos ingredientes ativos, seja *M. anisopliae* ou *B. bassiana*, com esporos em arroz, embora apresentando valores numéricos de dose maiores, tem acrescido nas recomendações de uso o peso dos grãos de arroz associados à formulação, enquanto o produto formulado comercialmente é resultado do processo de polimento do material (arroz + esporos), sendo posteriormente unido a inertes, normalmente adjuvantes. Sugere-se, então, que futuros estudos foquem a relação das diferentes formulações e seus ingredientes inertes, afim de se elucidar as possíveis razões do antagonismo verificado.

As combinações entre *B. bassiana* e *M. anisopliae* em formulação não comercial (arroz) acrescidas de Altacor®, resultaram em aumento da mortalidade da praga,

sendo essa uma relação de boa interação e dependente das espécies microbianas, da estrutura química dos inseticidas, das espécies hospedeiras e do habitat onde a relação ocorre (Zibaee, 2019). Outros autores afirmam ainda que a união de diferentes doses de bioinsetidas a inseticidas químicos pode causar aumento do estresse na praga e comprometimento do seu sistema imunológico, com consequente alteração na fisiologia e no comportamento dos insetos, especialmente quanto à sobrevivência e reprodução, resultando em características favoráveis a um programa de controle de insetos incluindo esses componentes biológicos (Pelizza, 2018).

As combinações Opala® + Granada®, *Ma* Arroz + *Bb* Arroz, Altacor® + *Bb* Arroz e Altacor® + *Ma* Arroz promoveram maiores mortalidades, demonstrando serem eficientes alternativas para o controle de *D. saccharalis,* posicionando-se como boas ferramentas à serem empregadas no MIP cana-de-açúcar. Saliente-se que, sendo produtos com diferentes modos de ação, se caracterizam como boas ferramentas para o manejo da resistência, podendo controlar ao mesmo tempo alvos diferentes, uma vez que os fungos entomopatogênicos empregados neste estudos são comumente utilizados no manejo das cigarrinhas das raízes e de *S. levis* em cana (Marques, 2019), insetos-praga que podem ocorrer simultaneamente na cultura.

As misturas Opala® + Granada®, *Ma* Arroz + Granada®, Altacor® + *Bb* Arroz e *Ma* Arroz apresentaram efeitos satisfatórios para o controle de *D. saccharalis.* Porém, estudos futuros devem considerar o emprego de diferentes doses na combinação dos mesmos.

O conhecimento sobre seus ingredientes ativos, bem como dos inertes contidos nos produtos comerciais utilizados neste estudo, devem ser conhecidos e estudadas suas interações, uma vez que existe a possibilidade de interferirem na ação inseticida dos produtos sobre *D. saccharalis.*

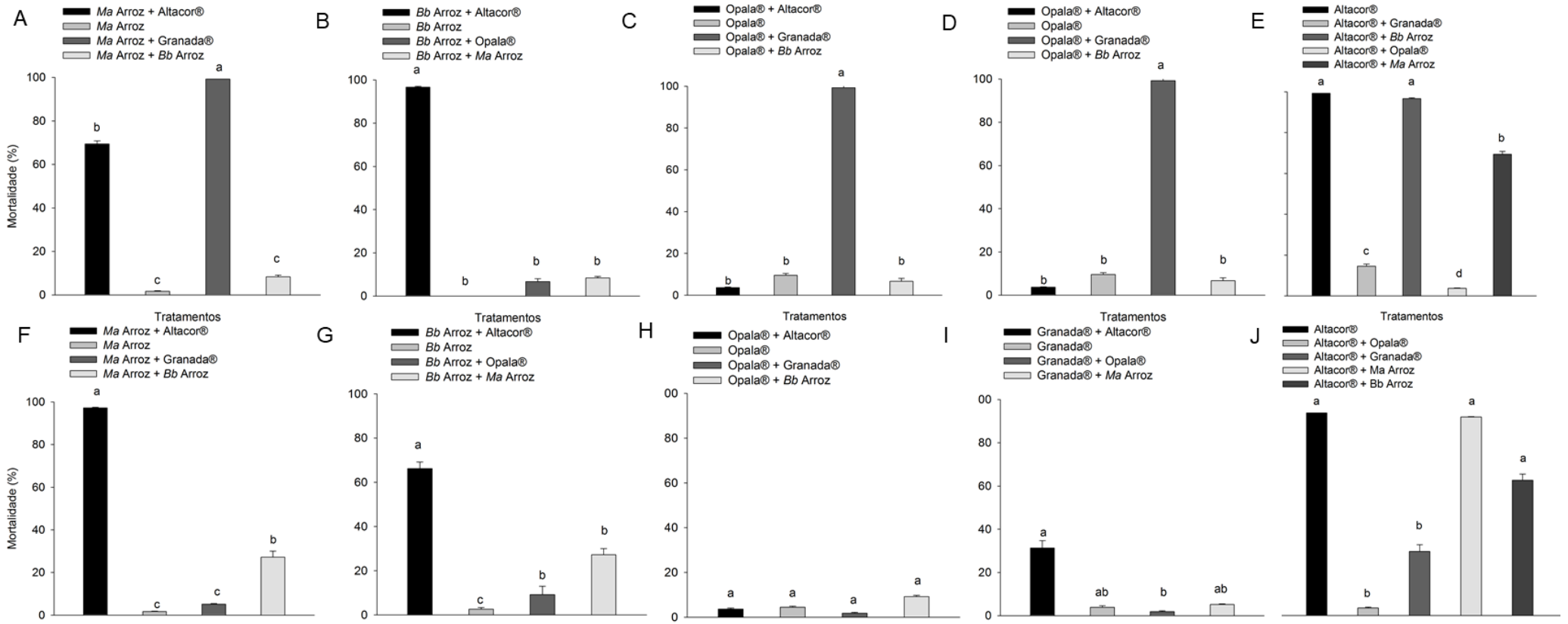

Figura 2. Porcentagem de mortalidade de *Diatraea saccharalis* tratada com misturas entre espécies de fungos e Altacor®. A (*Ma* Arroz), B (*Bb* Arroz), C (Opala®), D (Granada®) e E (Altacor®) - Misturas de caldas; F (*Ma* Arroz), G (*Bb* Arroz), H (Opala®), I (Granada®) e J (Altacor®) - Crescimento em placa (Colônias).

4.3 Parâmetros biológicos de *Diatraea saccharalis* com ovos expostos aos diferentes tratamentos

O período larval das lagartas oriundas dos ovos tratados foi maior nos tratamentos com Tween® (55,79 dias), Água (56,57 dias) e no controle sem tratamento (56,56 dias), seguidos de Opala® e Altacor®, com médias de 32,40 e 33,71 dias (χ^2 = 777,27; GL = 8 e P < 0,0001), respectivamente. O resultado com Opala® se assemelha ao período larval obtido por Oliveira et al. (2008) ao tratarem lagartas com 1,0 x 10^5 con.mL^{-1} de *M. anisopliae* (34,9 dias). Destaque deve ser dado para Dipel® que provocou redução no período larval de *D. saccharalis*, com média de 25,46 dias, sendo significativamente diferente de todos os demais tratamentos (Tabela 3).

A viabilidade larval foi menor nos tratamentos com fungos em arroz, 83,87% para *B. bassiana* e 84,73% para *M. anisopliae* (χ^2 = 22,75; GL = 8 e P = 0,0037), porém diferindo significativamente apenas do Tween® 20 (Tabela 3).

Tabela 3. Viabilidade e período larval de *Diatraea saccharalis* com ovos expostos aos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Período larval (dias)	Viabilidade larval (%)
Tween®20 (Polisorbato)	55,79±0,20 a	98,98±1,02 a
Água	56,57±0,26 a	94,68±2,32 ab
Controle	56,56±0,21 a	93,57±2,35 ab
Granada®	27,57±0,20 d	88,37±2,45 ab
B. bassiana Arroz	27,99±0,23 d	83,87±2,97 b
Opala®	32,40±0,83 c	88,88±2,41 ab
M. anisopliae Arroz	28,00±0,24 d	84,73±3,15 b
Dipel®	25,46±0,18 e	89,71±2,30 ab
Altacor®	33,71±0,46 b	89,14±2,35 ab
χ^2	777,27	22,75
DF	8	8
P	<0,0001	0,0037

[1]Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos na coluna. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05).

As pupas da broca provenientes de ovos tratados apresentaram os menores períodos de desenvolvimento no tratamento Opala®, com período pupal de 6,91 dias, diferindo dos demais tratamentos, com os maiores valores encontrados para Altacor® e Dipel® (8,87 e 8,63 dias, respectivamente) ($\chi^2 = 146,27$; GL = 8 e $P < 0,0001$), porém não diferindo do controle, água e Tween®20 (Tabela 4).

A viabilidade de pupas foi afetada apenas nos tratamentos com *B. Bassiana* em Arroz e *M. anisopliae* em Arroz, sendo 83,76% para *B. bassiana* e 84,73% para *M. anisopliae*, valores que diferiram apenas do controle com Tween®20, com viabilidade média de 98,98% ($\chi^2 = 22,85$; GL = 8 e $P = 0,0036$) (Tabela 4).

Tabela 4. Período e viabilidade pupal de *Diatraea saccharalis* com ovos expostos aos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Período pupal (dias)	Viabilidade pupal (%)
Tween®20 (Polisorbato)	8,62±0,06 ab	98,98±1,02 a
Água	8,50±0,08 abc	94,68±2,32 ab
Controle	8,59±0,07 ab	93,57±2,35 ab
Granada®	8,16±0,07 c	88,37±2,45 ab
B. bassiana Arroz	8,35±0,08 bc	83,76±2,98 b
Opala®	6,91±0,18 d	88,82±2,42 ab
M. anisopliae Arroz	8,18±0,07 c	84,73±3,15 b
Dipel®	8,63±0,10 a	89,65±2,31 ab
Altacor®	8,87±0,09 a	88,88±2,41 ab
χ^2	146,27	22,85
DF	8	8
P	<0,0001	0,0036

[1]Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos na coluna. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Os produtos testados causaram redução no peso das pupas, com valores entre 0,18 e 0,19 g, com o peso médio do controle de 0,21 g, com as lagartas sob influência dos diferentes produtos apresentando menor consumo de alimento, gerando pupas mais leves, dando origem a ovos nutricionalmente menos adequado ao desenvolvimento dos parasitoides e/ou com efeito tóxico (χ^2 = 73,23; GL = 8 e *P* < 0,0001) (Tabela 5).

A maior longevidade de adultos machos foi observada com Opala®, onde os insetos viveram em média 4,30 dias, enquanto os menores foram obtidos nos controles, variando de 2,45 a 2,62 dias (χ^2 = 46,82; GL = 8 e *P* < 0,0001). Nas fêmeas a maior longevidade foi observada também com Opala® (4,35 dias), sendo todos os demais tratamentos semelhantes entre si, com valores entre 3,00 dias (Água) e 3,65 dias (Altacor®) (χ^2 = 19,10; GL = 8 e *P* = 0,0143) (Tabela 5).

Tabela 5. Peso de pupas, longevidade de machos e longevidade de fêmeas de *Diatraea saccharalis* com ovos expostos aos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Peso de pupas (g)	Longevidade de machos (dias)	Longevidade de fêmeas (dias)
Tween®20 (Polisorbato)	0,20±0,01 ab	2,63±0,11 cd	3,47±0,22 b
Água	0,20±0,01 ab	2,62±0,13 cd	3,00±0,13 b
Controle	0,21±0,01 a	2,45±0,19 d	3,47±0,22 b
Granada®	0,19±0,00 bc	3,05±0,21 bcd	3,45±0,23 b
B. bassiana Arroz	0,19±0,00 bc	3,40±0,15 b	3,50±0,22 b
Opala®	0,19±0,00 bc	4,30±0,29 a	4,35±0,32 a
M. anisopliae Arroz	0,19±0,00 bc	3,45±0,11 b	3,40±0,13 b
Dipel®	0,19±0,00 bc	3,00±0,18 bcd	3,60±0,15 b
Altacor®	0,18±0,00 c	3,22±0,23 bc	3,68±0,25 b
χ^2	73,23	46,82	19,10
DF	8	8	8
P	<0,0001	<0,0001	0,0143

[1]Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos na coluna. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Os resultados para a razão sexual indicam que todos os tratamentos utilizados neste bioensaio foram semelhantes entre si, com razões variando entre 0,35 e 0,52 (χ^2 = 9,08; GL = 8 e *P* = 0,3349) (Tabela 6). Porém, em relação ao número de ovos por fêmea, no controle foi constatada a maior fecundidade (520 ovos por fêmea), porém, não diferindo estatisticamente de Granada®, Bb Arroz e Dipel®, enquanto as menores quantidades de ovos por fêmea foram obtidas com Opala® (321,63), Altacor® (324,00) e *M. anisopliae* em Arroz (353,30) (χ^2 = 28,89; GL = 8 e *P* = 0,0003), com todos diferindo do controle (Tabela 6).

Beauveria bassiana diminuiu a viabilidade de larvas e de pupas, enquanto que Dipel® reduziu o período larval e o número de descendentes nas concentrações subletais, mostrando-se ser uma boa estratégia quando empregada pouco antes da eclosão das lagartas, o que diminuiria o dano da praga no campo. Altacor® resultou em diminuição do peso de pupas e também no número de descendentes por fêmea, tendo seu efeito sistêmico garantido um residual que, mesmo a 1% da sua dose recomendada poderia causar efeitos negativos devido ao fato das lagartas continuarem se alimentando nos tecidos vegetais contendo resíduos do produto.

Tabela 6. Razão sexual e número de ovos por fêmea de *Diatraea saccharalis* com exposição de ovos aos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Razão sexual	Ovos/fêmea
Tween®20 (Polisorbato)	0,45±0,05 a	526,31±35,48 a
Água	0,52±0,05 a	546,53±34,19 a
Controle	0,45±0,04 a	520,00±46,65 a
Granada®	0,47±0,04 a	427,85±40,54 ab
B. bassiana Arroz	0,45±0,04 a	385,27±36,98 ab
Opala®	0,46±0,04 a	321,63±47,90 b
M. anisopliae Arroz	0,45±0,04 a	353,30±36,51 b
Dipel®	0,35±0,03 a	456,43±41,27 ab
Altacor®	0,44±0,03 a	324,00±40,32 b
χ^2	9,08	28,89
DF	8	8

P	0,3349	0,0003

[1]Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos na coluna. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Os resultados obtidos para o desenvolvimento de *D. saccharalis* são importantes porque demostram o quanto os produtos biológicos podem contribuir na redução da injúria e dos danos causados pela praga, e em proporção maior do que o observado para o inseticida químico. Como observado para o período larval, sua redução acarreta menor tempo de alimentação desses insetos nos colmos de cana-de-açúcar e, somado à diminuição do impacto ambiental com o uso de inseticidas biológicos, evidencia dados promissores na associação de métodos de controle pelo uso de parasitoide e moléculas não químicas (Odum, 1988; Braga et al., 2003), diminuindo, assim, o impacto na biodiversidade e estabelecendo o controle biológico de maneira mais efetiva (Altieri et al., 2003).

4.4 Efeito transgeracional em *Trichogramma galloi* com ovos hospedeiros expostos aos diferentes tratamentos

O número de ovos de *D. saccharalis* parasitados por *T. galloi* em F_1 (com tratamento em F_0) mostrou enorme diferença entre os tratamentos, sendo os menores valores no Altacor® (4,16 ovos) e no controle (0,40 ovos), não diferindo de *M. anisopliae* em Arroz, enquanto o maior índice de parasitismo foi com Água (38,70 ovos). Os outros tratamentos, exceção ao *M. anisopliae* em Arroz (5,43 ovos) foram equivalentes, com valores variando entre 11,80 e 16,20 ovos parasitados ($F_{132,03}$; GL = 8 e $P < 0,0001$) (Tabela 7).

A porcentagem de parasitismo foi maior nos tratamentos Dipel® e *M. anisopliae* em Arroz (38,27% e 33,41%, respectivamente), não apresentando diferença quando comparados com Água (28,11%), Granada® (24,74%), *B. bassiana* em Arroz (12,90%), Opala® (28,42%) e Altacor® (13,30%). Saliente-se que as porcentagens de parasitismo no tratamento Tween®20 e controle, praticamente não existiram, contudo, diferiram estatisticamente apenas dos tratamentos *M. anisopliae* em Arroz e Dipel® ($F_{84,77}$; GL = 8 e $P < 0,0001$) (Tabela 7).

Quanto ao parasitismo, Antigo et al. (2013) ao avaliarem a seletividade direta de Clorantraniliprole e *M. anisopliae* utilizando a metodologia de imersão dos ovos nas caldas inseticidas, verificaram que 23,78% dos ovos de *D. saccharalis* tratados com os referidos produtos foram parasitados, porcentagem bem superior a encontrada neste trabalho.

Tabela 7. Número de ovos parasitados e porcentagem de parasitismo por *Trichogramma galloi* quando os ovos hospedeiros foram expostos aos diferentes tratamentos.

Tratamentos	[1]Número de ovos parasitados	Porcentagem de Parasitismo
Tween®20 (Polisorbato)	11,80±1,59 b	00,49±0,34 b
Água	38,70±3,24 a	28,11±6,71 ab
Controle	0,40±0,29 c	0,00±0,00 b
Granada®	13,60±1,29 b	24,74±4,61 ab
B. bassiana Arroz	12,13±2,13 b	12,90±3,50 ab
Opala®	14,96±1,51 b	28,42±5,17 ab
M. anisopliae Arroz	5,43±1,41 cb	38,27±6,19 a
Dipel®	16,20±1,32 b	33,41±5,35 a
Altacor®	4,16±1,33 c	13,30±12,00 ab
F	132,03	84,77
GL	8	8
P	<0,0001	<0,0001

[1]Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos na coluna. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05).

A tabela 8 mostra que a porcentagem de emergência de adultos foi significativamente menor nos ovos tratados com Dipel® e Altacor® (17,14% e 10,41%, respectivamente) ($\chi^2 = 88,52$; GL = 8 e $P < 0,0001$), com os demais tratamentos não diferindo entre si e nem dos controles. Esses dados diferem dos observados por Narazaki (2019), que obteve em F_1, após aplicação de Altacor® em ovos, 95,5% de porcentagem de emergência.

Quanto a duração do período de ovo a adulto do parasitoide, o menor valor foi para o Dipel® (13,86 dias), não diferindo do controle (16,33 dias). Por outro lado, os períodos mais longos foram observados com Água (20,91 dias), Granada® (22,10 dias), Opala® (23,64 dias), *M. anisopliae* em Arroz (23,73 dia) e Altacor® (20,41 dias) ($F_{8,173}$; GL = 8 e $P < 0,0001$) (Tabela 8), destacando-se que todos esses resultados são bastante diferentes daquele citado por Pereira-Barros et al. (2005), que obtiveram média de 9,46 dias para o período de ovo a adulto quando os ovos não receberam tratamento.

Tabela 8. Porcentagem de emergência e período de ovo a adulto de *Trichogramma galloi*, quando os ovos hospedeiros foram expostos aos diferentes tratamentos.

Tratamentos	[1]Emergência (%)	Período ovo-adulto (dias)
Tween®20 (Polisorbato)	82,61±4,68 a	23,17±0,68 a
Água	83,77±4,87 a	20,91±0,58 a
Controle	58,33±22,04 ab	16,33±0,88 bc
Granada®	58,71±5,39 ab	22,10±0,62 a
B. bassiana Arroz	66,89±4,97 ab	17,36±1,04 b
Opala®	62,88±6,15 ab	23,64±0,65 a
M. anisopliae Arroz	54,21±5,77 b	23,73±0,86 a
Dipel®	17,14±1,49 c	13,86±0,60 c
Altacor®	10,41±0,62 c	20,41±0,62 a
χ^2	88,52	F=8,173
GL	8	8
P	<0,0001	<0,0001

[1]Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos na coluna. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05).

A análise do parâmetro de longevidade demonstra que os adultos oriundos de ovos tratados com *B. bassiana* em Arroz, bem como aqueles do controle, apresentaram os maiores períodos de vida (13,36 e 13,33 dias, respectivamente), diferindo apenas do tratamento com Água (8,91 dias) ($F_{8,173}$ = ???; GL = 8 e $P < 0,0001$) (Tabela 9), sendo

que Narazaki (2019) cita longevidade de 5,67 dias, até mesmo na presença de Altacor®, enquanto Valente et al. (2016) relatam 8,13 dias.

Quanto ao número de descendentes em F_1, houve diminuição no número de adultos no controle (2,66 adultos), valor semelhante aos encontrados para *M. anisopliae* em Arroz e Altacor®, respectivamente (9,86 e 7,28 adultos). Os maiores números de descendentes foram para *B. bassiana* em Arroz, Tween®20 e Água (19,57; 19,66 e 20,18 adultos, respectivamente), contudo, não diferindo estatisticamente de Granada®, Opala® e Dipel® ($F_{26,69}$; GL = 8 e $P < 0,0004$) (Tabela 9).

Tabela 9. Longevidade de *Trichogramma galloi* e número de descendentes (F_1) com os ovos dos hospedeiros expostos aos diferentes tratamentos.

Tratamentos	[1]Longevidade	Número de adultos
Tween®20 (Polisorbato)	11,17±0,68 ab	19,66±1,93 a
Água	8,91±0,58 b	20,18±1,66 a
Controle	13,33±0,88 a	2,66±0,88 c
Granada®	10,10±0,62 ab	15,75±2,45 ab
B. bassiana Arroz	13,36±1,04 a	19,57±1,75 a
Opala®	11,64±0,65 ab	16,03±2,06 ab
M. anisopliae Arroz	11,73±0,86 ab	9,86±2,27 abc
Dipel®	9,68±0,60 ab	17,14±1,49 ab
Altacor®	10,41±0,62 ab	7,28±2,00 bc
F	8,173	26,69
GL	8	8
P	0,0013	0,0018

[1]Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos na coluna. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05).

4.5 Parâmetros biológicos de *Diatraea saccharalis* com lagartas expostas aos diferentes tratamentos

O período larval de *D. saccharalis* tratada com Altacor® apresentou aumento significativo em relação aos controles, com período médio de 39,09 dias, sendo que os demais tratamentos não diferiram significativamente entre eles ($\chi^2 = 70,69$; GL = 8

e *P* < 0,0001) (Tabela 10). Segundo Ribeiro (2014), Clorantraniliprole também provocou o aumento no período larval de *P. xylostela* quando lagartas suscetíveis e resistentes foram tratadas com CL_{10}, CL_{25} e CL_{50} de Clorantraniliprole. A viabilidade larval foi afetada apenas pelo Altacor® (49,24%), com os demais tratamentos não diferindo significativamente entre eles, com viabilidades variando entre 91,66% a 98,97% ($\chi^2 = 340,02$; GL = 8 e *P* < 0,0001) (Tabela 10).

Tabela 10. Período e viabilidade larval de *Diatraea saccharalis* com lagartas expostas aos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Período larval (dias)	Viabilidade larval (%)
Tween®20 (Polisorbato)	34,97±0,34 d	96,93±1,74 a
Água	35,72±0,40 cd	92,85±2,61 a
Controle	37,46±0,44 b	98,97±1,02 a
Granada®	35,82±0,26 cd	93,26±1,80 a
B. bassiana Arroz	35,59±0,27 cd	93,90±1,70 a
Opala®	37,42±0,38 b	91,66±1,99 a
M. anisopliae Arroz	36,22±0,32 bcd	96,89±1,25 a
Dipel®	36,78±0,31 bc	92,74±1,87 a
Altacor®	39,09±0,53 a	49,24±3,55 b
χ^2	70,69	340,02
DF	8	8
P	<0,0001	<0,0001

[1]Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos na coluna. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Os maiores valores para o período pupal foram obtidos nos tratamentos com *B. bassiana* em ambas formulações, Granada® (10,19 dias) e arroz (10,45 dias), seguidos pelo Dipel® (9,86 dias) e Altacor® (9,28 dias). Apenas os tratamentos a base de *M. anisopliae* apresentaram valores semelhantes aos 3 controles ($\chi^2 = 458,93$; GL = 8 e *P* < 0,0001), enquanto Altacor® não diferiu de Tween®20 e do controle (sem tratamento) (Tabela 11).

Quanto a viabilidade da fase pupal, somente o Altacor® resultou em diminuição, obtendo-se apenas 48,4% das pupas das lagartas tratadas, se contrapondo aos dados relatados por Ribeiro (2014), onde, ao tratar lagartas com CL_{10} de Clorantraniliprole, não obteve alteração na viabilidade das pupas de *P. xylostela* (χ^2 = 316,15; GL = 8 e *P* < 0,0001).

Tabela 11. Período e viabilidade pupal de *Diatraea saccharalis* com lagartas expostas aos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Período pupal (dias)	Viabilidade pupal (%)
Tween®20 (Polisorbato)	9,10±0,09 de	95,91±2,00 a
Água	8,85±0,11 e	91,83±2,78 a
Controle	9,09±0,10 de	98,97±1,02 a
Granada®	10,19±0,06 b	91,70±1,98 a
B. bassiana Arroz	10,45±0,06 a	93,90±1,70 a
Opala®	8,77±0,07 e	89,58±2,21 a
M. anisopliae Arroz	8,78±0,06 e	96,37±1,34 a
Dipel®	9,86±0,07 c	91,70±1,98 a
Altacor®	9,28±0,11 d	48,4±3,55 b
χ^2	458,93	316,15
DF	8	8
P	<0,0001	<0,0001

[1]Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos na coluna. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Os tratamentos com os produtos químico e biológicos apresentaram pesos de pupas semelhantes. Nos controles as médias dos pesos pupais variaram entre 0,175 e 0,183 g, com os tratamentos (químico e biológicos), apresentando médias entre 0,161 g e 0,180 g (χ^2 = 22,70; GL = 8 e *P* = 0,0038). O tratamento *M. anisopliae* em Arroz diferiu estatisticamente da Água e do controle sem tratamento,sendo semelhante aos demais

(Tabela 12). Esses resultados corroboram com os citados por Simi (2010) que, ao submeter lagartas de *D. saccharalis* a aplicação respectiva de 10^6 e 10^7 con.mL^{-1} de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, obteve valores para peso de pupas fêmeas de 0,1833 g e 0,14587 g, respectivamente.

As longevidades de machos (χ^2 = 23,97; GL=8 e *P* = 0,0023) e de fêmeas (χ^2 = 8,66; GL = 8 e P = 0,0164) não apresentaram diferenças significativas em relação aos tratamentos Tween®, Água e controle, mostrando que os tratamentos não interferem nesse parâmetro biológico do inseto (Tabela 12). Contudo, para a longevidade dos machos, o tratamento Dipel® diferiu estatisticamente dos tratamento Tween®20, Água e *M. anisopliae* em Arroz, que não diferiram dos demais tratamentos. Para a longevidade das fêmeas, os tratamentos Tween®20 e Granada® diferiram estatisticamente de Altacor®, *B. bassiana* em Arroz e controle sem tratamento.

Tabela 12. Peso de pupas, longevidade de machos e longevidade de fêmeas de *Diatraea saccharalis* obtidos com lagartas expostas aos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Peso de pupas (g)	Longevidade de machos (dias)	Longevidade de fêmeas (dias)
Tween®20 (Polisorbato)	0,175±0,004 abc	3,25±0,31 a	3,75±0,20 a
Água	0,183±0,004 a	3,20±0,17 a	3,55±0,15 ab
Controle	0,180±0,004 ab	2,50±0,17 ab	3,10±0,19 b
Granada®	0,164±0,002 bc	3,00±0,21 ab	3,70±0,14 a
B. bassiana Arroz	0,168±,003 abc	2,71±0,14 ab	3,09±0,18 b
Opala®	0,175±0,003 abc	2,70±0,17 ab	3,47±0,16 ab
M. anisopliae Arroz	0,161±0,003 c	3,15±0,10 a	3,05±0,16 ab
Dipel®	0,169±0,003 abc	2,30±0,14 b	3,40±0,19 ab
Altacor®	0,167±0,004 abc	2,68±0,19 ab	3,04±0,16 b
χ^2	22,70	23,97	18,66
DF	8	8	8
P	0,0038	0,0023	0,0164

[1]Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos na coluna. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Os resultados da razão sexual e do número de ovos por fêmea não foram estatisticamente diferentes, variando de 0,45 a 0,56 para a razão sexual, e de 302,75 a 419,30 para o número de ovos ($F_{0,88}$; GL = 8 e *P* = 0,5348) (Tabela 13), com valores semelhantes citados por Ribeiro (2014) analisando efeitos subletais de Clorantraniliprole em *P. xylostela*.

Avaliando os efeitos dos tratamentos em lagartas de 2º ínstar, os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* promoveram os menores períodos de pupais e, de maneira um pouco menos expressiva, também menores pesos de pupas. Por outro lado, clorantraniliprole alonga o periodo larval, reduz em cerca de 50% a viabilidade de larvas e também diminui a viabilidade pupal, semelhante aos efeitos encontrados quando os ovos foram tratados.

Tabela 13. Razão sexual e número de ovos de *Diatraea saccharalis* obtidos com lagartas expostas aos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Razão sexual	Número de ovos
Tween®20 (Polisorbato)	0,51±0,03 a	419,30±44,47 a
Água	0,50±0,03 a	342,80±43,80 a
Controle	0,56±0,05 a	379,90±47,54 a
Granada®	0,46±0,03 a	337,25±34,35 a
B. bassiana Arroz	0,45±0,036 a	400,90±31,09 a
Opala®	0,53±0,03 a	345,66±30,08 a
M. anisopliae Arroz	0,46±0,03 a	354,66±30,05 a
Dipel®	0,45±0,03 a	314,52±37,75 a
Altacor®	0,48±0,05 a	302,75±49,86 a
F	8,175	0,88
χ^2	7,74	-
DF	8	8
P	0,4587	0,5348

[1]Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos na coluna. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05).

4.6 Efeito transgeracional em *Trichogramma galloi* com lagartas expostas aos diferentes tratamentos

Quando o parasitismo foi realizado em ovos oriundos de fêmeas cujas lagartas foram tratadas ocorreu maior número de ovos parasitados onde as lagartas receberam as aplicações de Granada®, *B. bassiana* em Arroz e Opala®, com 17,16; 17,09 e 16,96 ovos parasitados, respectivamente, valores esses que não diferiram dos três controles (Tween, água e sem tratamento) e de *M. anisopliae* em Arroz, diferindo porém de Dipel® e Altacor® que promoveram os menores números de ovos parasitados (9,20 e 9,38 ovos, respectivamente) ($F_{39,77}$; GL = 8 e $P < 0,0001$), (Tabela 14). Esses valores são próximos dos obtidos por Narazaki (2019) que avaliou em F_1 ovos contaminados por Clorantraniliprole, obtendo média de 12,60 ovos parasitados.

A porcentagem de parasitismo foi maior no tratamento com *B. bassiana* em Arroz (62,79%) e com Água (65,84%), ambos diferindo estatisticamente somente do Dipel® (25,83%) e do controle (35,42%), com os dois últimos não mostrando diferença estatística entre si ($F_{10,92}$; GL = 8 e $P = 0,2059$) (Tabela 14).

Tabela 14. Número de ovos de *Diatraea saccharalis* parasitados e porcentagem de parasitismo por *Trichogramma galloi* quando as lagartas hospedeiras foram tratadas.

Tratamentos	[1]Número de ovos parasitados	Porcentagem de parasitismo
Tween®20 (Polisorbato)	14,13±1,31 ab	46,26±5,38 ab
Água	13,93±1,26 ab	65,84±4,76 a
Controle	13,68±2,26 ab	35,42±6,96 bc
Granada®	17,16±1,24 a	52,37±5,46 ab
B. bassiana Arroz	17,09±1,69 a	62,79±6,76 a
Opala®	16,96±1,66 a	48,64±4,57 ab
M. anisopliae Arroz	15,33±1,26 ab	59,50±5,58 ab
Dipel®	9,20±1,51 b	25,83±6,61 c
Altacor®	9,38±1,64 b	57,28±7,57 ab
F	39,77	10,92
GL	8	8
P	<0,0001	0,2059

[1]Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos na coluna. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05).

A porcentagem de emergência de adultos foi significativamente menor quando as lagartas foram tratadas com Dipel® (6,31%), seguido do Altacor® (61,52%) (χ^2 = 92,97; GL = 8 e *P* < 0,0001), sendo que este resultado, em relação ao inseticida químico, corrobora com os citados por Antigo et al. (2013), que trataram ovos em calda com clorantraniliprole para depois submete-los ao parasitismo, obtendo emergência de adultos da ordem de 54,10%. Exceção feita ao Dipel® e ao Altacor®, os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre eles (Tabela 15).

Quanto a duração do período de ovo a adulto do parasitoide, os menores valores foram obtidos com o Tween®20 (18,53 dias), *B. bassiana* em Arroz (18,65 dias) e Opala® 19,33 dias), com os dois primeiros não diferindo dos tratamentos com água, Granada®, *M. anisopliae* em Arroz e Altacor®. Opala® também não diferiu do tratamento com Dipel®. (χ^2 = 36,67; GL = 8 e *P* < 0,0001) (Tabela 15).

Tabela 15. Porcentagem de emergência e período de ovo a adulto de *Trichogramma galloi* quando as lagartas hospedeiras foram tratadas.

Tratamentos	[1]Emergência (%)	Período ovo-adulto
Tween®20 (Polisorbato)	93,53±1,31 a	18,53±0,57 c
Água	85,55±3,41 a	19,83±0,54 bc
Controle	84,00±4,15 a	21,71±0,38 a
Granada®	85,53±3,71 a	20,10±0,47 abc
B. bassiana Arroz	78,40±5,62 a	18,65±0,46 c
Opala®	79,96±2,13 a	19,33±0,37 bc
M. anisopliae Arroz	85,96±2,13 a	20,26±0,49 abc
Dipel®	6,31±0,95 c	21,00±0,51 ab
Altacor®	61,52±6,60 b	19,74±0,36 bc
χ^2	92,97	36,67
GL	8	8
P	<0,0001	<0,0001

[1]Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos na coluna. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Quando as lagartas foram tratadas com os bioinseticidas e com o inseticida químico não foram observados efeitos na longevidade dos adultos do parasitoide, obtendo-se períodos de sobrevivência variando entre 7 e 9 dias ($\chi^2 = 24,68$; GL = 8 e $P = 0,0018$) (Tabela 16). Polanczyk et al. (2010) testando a ação direta de fungos comerciais na longevidade de *T. atopovirilia* encontraram resultados semelhantes.

Já, em relação ao número de descendentes na geração F_1 após os tratamentos, verificou-se diminuição na quantidade de adultos apenas no tratamento com Altacor®, com média de 12,36 indivíduos ($F_{8,22}$; GL = 8 e $P < 0,0001$) (Tabela 16).

A porcentagem de emergência e número de descendentes foram afetados pelo tratamento de ovos e de lagartas com Dipel® e Altacor® em doses abaixo das utilizadas em campo, indicando que o conceito de seletividade não deve ser considerado apenas quanto a mortalidade, avaliando-se também outros parâmetros do inseto, uma vez nesse trabalho foi verificado que inseticidas (químicos e biológicos) podem resultar em problemas na performance de *T. galloi*.

Tabela 16. Longevidade de *Trichogramma galloi* e número de descendentes em (F_1) quando as lagartas hospedeiras foram tratadas.

Tratamentos	[1]Longevidade	Número de adultos
Tween®20 (Polisorbato)	7,66±0,55 a	22,20±2,19 a
Água	8,83±0,54 a	23,35±1,76 a
Controle	8,75±0,38 a	26,04±3,03 a
Granada®	8,10±0,47 a	28,25±1,67 a
B. bassiana Arroz	7,93±0,48 a	22,85±1,88 a
Opala®	8,66±0,38 a	25,55±1,65 a
M. anisopliae Arroz	9,26±0,49 a	24,23±1,99 a
Dipel®	9,68±0,53 a	20,73±2,09 a
Altacor®	8,90±0,34 a	12,36±1,77 b
χ^2	24,68	F = 8,223
GL	8	8
P	0,0018	<0,0001

[1]Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos na coluna. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05).

5. CONCLUSÃO

- As combinações Opala® + Granada®, *Ma* Arroz + *Bb* Arroz, Altacor® + *Bb* Arroz e Altacor® + *Ma* Arroz demonstram ser eficientes alternativas de controle para *D. saccharalis*;

- As combinações entre Altacor® e Opala® e Granada® necessitam de mais estudos, quanto a suas concentrações de inertes e ingredientes ativos;

- Quando aplicado nos ovos de *D. saccharalis*, *B. bassiana* diminui a viabilidade das larvas e de pupas, enquanto que Dipel® reduz o período larval e o número de descendentes em concentrações subletais, enquanto Altacor® resulta em diminuição do peso de pupas e também no número de descendentes por fêmea;

- Em lagartas de 2º instar de *D. saccharalis*, *B. bassiana* e *M. anisopliae* apresentam menores períodos pupal e menores no peso das pupas, enquanto Altacor® alonga o periodo larval, reduz a viabilidade larval e diminui a viabilidade das pupas;

- Dipel® e Altacor® reduzem o número de ovos parasitados por *T. galloi*, bem como a porcentagem de emergência e número de descendentes pelo tratamento de ovos e de lagartas de *D. saccharalis*.

6. REFERÊNCIAS

Agência Estado (2018) CTNBio aprova nova variedade de cana transgênica no CTC resistente a insetos. Disponível em: <https://www.novacana.com/n/cana/variedades/ctnbio-nova-variedade-cana-transgenica-ctc-resistente-insetos-181218>. Acesso em: 05 jan. 2021.

Agrofit (2021) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Consulta de pragas e doenças. Disponível em:<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 05 jan. 2021.

Almeida LC, Arrigoni EB (1994) Controle da broca da cana-da-açúcar, *Diatraea saccharalis*, com o parasitóide de ovos *Trichogramma galloi*. **Seminário Copersucar de Tecnologia Agronômica** 183:191.

Almeida JEM, Batista Filho A (2001) Banco de microrganismos entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 20:30-33.

Altieri MA, Silva EN, Nicholls CI (2003) **O papel da biodiversidade no manejo de pragas**. Ribeirão Preto: Editora Holos Ltda. 226 p.

Alves SB (1998) Fungos entomopatogênicos. In: Alves SB (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq. p. 289-381.

Alves SB, Moura LEP, Azevedo EMM, Almeida LC (1985) Controle da broca da cana-de-açúcar pelo uso de *Beauveria bassiana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 20(4):403-406.

Andrade ET, Carvalho SRG, Souza LF (2009) Programa do Proálcool e o etanol no Brasil. **Engevista** 11(2):127-136.

Antigo MR, Oliveira HN, Carvalho GA, Pereira FF (2013) Repelência de produtos fitossanitários usados na cana-de-açúcar e seus efeitos na emergência de *Trichogramma galloi*. **Revista Ciência Agronômica** 44(4):910-916.

Barbee GC, Mcclain WR, Lanka SK, Stout MJ (2010) Acute toxicity of chlorantraniliprole to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice–crayfish cropping systems. **Pest Management Science** 66(9):996-1001.

Batista Filho A, Alves SB, Alves LFA, Pereira RM, Ausgusto NT (1998) Formulação de entomopatógenos. In: Alves SB (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq. p. 917-966.

Benedini MS (2006) Controle biológico de pragas na cana-de-açúcar. In: Marques MO, Mutton MA, Azania AAPM, Tasso JRLC, Nogueira GA, Vale DW (Eds.) **Tópicos em tecnologia sucroalcooleira**. Jaboticabal: Multipress Ltda. p. 101-120.

Bleicher E, Parra JRP (1990) Espécies de *Trichogramma* parasitóides de *Alabama argillacea*. III. Determinação das exigências térmicas de três populações. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 25(2):215-219.

Bohorova N, Maciel AM, Brito RM, Aguillart L, Ibarra JE, Hoisington D (1996) Selection and characterization of mexican strains of *Bacillus thuringiensis* active against four major lepidopteran maize pests. **Entomophaga** 41:153-165.

Botelho PSM, Macedo N (2002) *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: Parra JRP, Botellho PSM, Corrêa-Ferreira BS, Bento JMS (Eds.) **Controle biológico no Brasil**: parasitoides e predadores. São Paulo: Manole. p. 409-426.

Botelho PSM, Parra JRP, Magrini EA, Haddad ML, Resende LCL (1995a) Parasitismo de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) por *Trichogramma galloi* Zucchi, em diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 24:141-145.

Botelho PSM, Parra JRP, Magrini EA, Haddad ML, Resende LCL (1995b) Efeito do número de liberações de *Trichogramma galloi* (Zucchi, 1988) no parasitismo de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). **Scientia Agricola** 52(1):65-69.

Braga DP, Arrigoni EB, Silva-Filho MC, Ulian EC (2003) Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds** 5(2-3):209-221.

Brugger KE, Cole PG, Newman IC, Parker N, Scholz B, Suvagia P, Walker G, Hammond TG (2010) Selectivity of chlorantraniliprole to parasitoid wasps. **Pest Management Science** 10(66):1075-1081.

Calvin DD, Knapp MC, Welch SM, Poston FL, Elzinga RJ (1984) Impact of environmental factors on *Trichogramma pretiosum* reared on southwestern corn borer eggs. **Environmental Entomology** 13(3):774-780.

Cloyd RA (2011) Pesticide mixtures. In: Stoytcheva M (Ed.) **Pesticides formulations, effects, fate**. Rijeka: InTech. p. 69-80.

CONAB Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira**: cana-de-açúcar. Safra 2016/2017. Segundo levantamento, agosto 2016 - Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília, DF, 2016. Disponivel em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_08_18_12_03_30_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_16-17.pdf >. Acesso em: 05 Jan. 2021.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento de safra brasileira**: cana-de-açúcar. 2019. Safra 2019/2020. Disponível em:< https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 05 Jan. 2021.

Cônsoli FL, Rossi MM, Parra JRP (1999) Developmental time and characteristics of the immature stages of *Trichogramma galloi* and *T. pretiosum* (Hymenoptera, Trichogrammatidae). **Revista Brasileira de Entomologia** 43:271-275.

Cônsoli FL, Botelho PSM, Parra JRP (2001) Selectivity of insecticides to the egg parasitoid *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hym., Trichogrammatidae). **Journal of Applied Entomology** 125(1-2):37-43.

Córdova D, Benner EA, Sacher MD, Rauh JJ, Sopa JS, Lahm GP, Tao Y (2006) Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 84(3):196-214.

Coutinho HLC (2009) Diversidade microbiana e agricultura sustentável. BDT – Base de dados Tropical. Disponível em:<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Diversidade_microbianaID-eUVKetj4E4.pdf>. Acesso em: 12 Jan. 2021.

Dara SK (2019**)** Interactions of entomopathogens with other pest management options. In: Khan A, Ahmad W (Eds.) **Microbes for sustainable insect pest management**. Cham: Springer. p. 299-316.

Degrande PE, Gomez DRS (1990) Seletividade de produtos químicos no controle de pragas. **Agrotécnica** 7:8-13.

De La Rosa W, Alatorre R, Barrera JF, Toriello C. (2000) Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. **Journal of Economic Entomology** 93(5):1409-1414.

De La Torre SL (1993) *Trichogramma*: biologia, sistemática y aplicación. Playa: Editorial Científico-Técnica. 316 p.

Dhanya MK, Sathyan T, Murugan M, Ashokkumar K, Surya R (2019) Compatibilidade in vitro de fungos entomopatogênicos com inseticidas sintéticos e óleo de nim. **Pesticide Research Journal** 31:275-281.

Dinardo-Miranda LL, Vasconcellos ACM, Landell MGA (2008) **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas. 882 p.

Dinardo-Miranda LL, Costa VP, Fracasso JV, Perecin D, Oliveira MC, Izeppi TS, Lopes DOP (2014) Resistance of sugarcane cultivars to *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology** 43(1):90-95.

Faria NMX, Fassa AG, Facchini LA (2007) Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência & Saúde Coletiva** 12(1):25-38.

Fenoll J, Garrido I, Cava J, Hellín P, Flores P, Navarro S (2015) Photometabolic pathways of chlorantraniliprole in aqueous slurries containing binary and ternary oxides of Zn and Ti. **Chemical Engineering Journal** 264:720-727.

Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJ (2008) Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal** 23(4):213-226.

Foerster LA (2002) Seletividade de inseticidas a predadores e parasitóides. In: Parra JRP, Botellho PSM, Corrêa-Ferreira BS, Bento JMS (Eds.) **Controle biológico no Brasil**: parasitoides e predadores. São Paulo: Manole. p. 95-114.

Francisco EA, Mochi DA, Correia ACB, Monteiro AC (2006) Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi. **Ciência Rural** 36(4):1309-1312.

Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Batista GC, Berti Filho E, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramim JD, Marchini LC, Lopes JRS, Omoto C (2002) **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: Fealq. 920 p.

Gandini EMM, Costa ESP, Santos JB, Soares MA, Barroso GM, Corrêa JM, Zanuncio JC (2020) Compatibility of pesticides and/or fertilizers in tank mixtures. **Journal of Cleaner Production** 268:122152.

Gazziero DLP (2015) Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. **Planta Daninha** 33(1):83-92.

Gitahy PM, Souza MT, Monnerat RG, Arrigoni EB, Baldani JI (2007) A Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Brazilian Journal of Microbiology** 38(3):531-537.

Grassi MCB, Pereira GAG (2019) Energy-cane and RenovaBio: Brazilian vectors to boost the development of Biofuels. **Industrial Crops and Products** 129:201-205.

Grenier S, Bernard P, Heddi A, Lassabliere F, Jager C, Louis C, Khatchadourian C (1998) Successful horizontal transfer of *Wolbachia* symbionts between *Trichogramma* wasps. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 265(1404):1441-1445.

Hensley SD, Hammond Jr. AH (1968) Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. **Journal of Economic Entomology** 61(6):1742-1743.

IRAC (2018) Comitê brasileiro de ação a resistência a inseticidas (IRAC-BR). Baseado na classificação do modo de ação - Versão 9.1 (Dezembro/18). Disponível em:<https://92813ac4-b3b4-47f4-a8b343c4292d561c.filesusr.com/ugd/2bed6c_286bc69768d7411aad20682dc95a99e2.pdf>. Acesso em: 20 dez 2020.

James RR, Elzen GW (2001) Antagonism between *Beauveria bassiana* and imidacloprid when combined for *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) control. **Journal of Economic Entomology** 94(2):357-361.

Jenkins NE, Grzywacz D (2000) Quality control of fungal and viral biocontrol agents-assurance of product performance. **Biocontrol Science and Technology** 10(6):753-777.

Jia M, Cao G, Li Y, Tu X, Wang G, Nong X, Zhang Z (2016) Biochemical basis of synergism between pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and insecticide chlorantraniliprole in *Locusta migratoria* (Meyen). **Scientific Reports** 6(1):1-15.

Krause ND (2014) Necessidades tecnológicas relacionadas a novos ingredientes ativos, formulações e da prática da realização de misturas de agrotóxicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS. Resumos 29, Gramado. Palestra.

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

Lopes JRS (1988) **Estudos bioetológicos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hym.: Trichogrammatidae) para o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lep.: Pyralidae)**. 141 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia), ESALQ/USP, Piracicaba.

Machado FBP (2014) Brasil, a doce terra. Araçatuba: UDOP – União dos Produtores de Energia. Disponível em: <http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=26351#nc>. Acesso em: 10 jan. 2021.

Marques MT (2019) Comparação do controle químico e biológico de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) na cultura da cana-de-açúcar. **Cogitare** 2(1):70-79.

Marrone PG (2019) Pesticidal natural products–status and future potential. **Pest Management Science** 75(9):2325-2340.

Mascarin GM, Lopes RB, Delalibera Júnior Í, Fernandes ÉKK, Luz C, Faria M (2019) Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology** 165:46-53.

Mena EFG (2010) **Toxicidade de inseticidas a *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae) e *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae)**. 61 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia), ESALQ/USP, Piracicaba.

Mendonça AF, Viveiros AJA, Sampaio Filho F (1996) A broca gigante da cana-de-açúcar, *Castnia licus* Drury, 1770 (Lep.: Castniidae). In: Mendonça AF (Ed.) **Pragas da cana-de-açúcar**. Maceió: Insetos & Cia. p. 133-167.

Micheletti SMFB (1987) **Distribuição espacial e temporal de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lep.: Pyralidae) e seu parasitismo por *Trichogramma* sp. (Hym: Trichogrammatidae)**. 85 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia), ESALQ/USP, Piracicaba.

Miranda JR (2008) **História da cana-de-açúcar**. Campinas: Komedi. 342 p.

Mora MAE, Castilho AMC, Fraga ME (2017) Classificacão e mecanismo de infecção dos fungos entomopatogênicos. **Arquivos do Instituto Biológico** 84:e0552015.

Narazaki MN (2019) **Toxicidade de inseticidas registrados para uso em cana-de-açúcar ao parasitoide *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia), ESALQ/USP, Piracicaba.

Natale Netto J (2007) **A saga do álcool**: fatos e verdades sobre os 100 anos do álcool combustível em nosso país. Osasco: Novo século. 343 p.

Nava DE, Pinto AS, Silva SDA (2009) **Controle biológico da broca da cana-de-açúcar**. Pelotas: Embrapa CPACT. 28 p. (Documentos, 287).

Nicolopoulou-Stamati P, Maipas S, Kotampasi C, Stamatis P, Hens L (2016) Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. **Frontiers in Public Health** 4:148.

Odum EP (1988) **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 434 p.

Oliveira DGP (2009) **Proposta de um protocolo para avaliação da viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos e determinação da proteção ao calor conferida a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pela formulação em óleo emulsionável**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia), ESALQ/USP, Piracicaba.

Oliveira MAP, Marques EJ, Teixeira VW, Barros R (2008) Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences** 30(2):219-224.

Oliveira HN, Antigo MR, Carvalho GA, Glaeser DF, Pereira FF (2013) Seletividade de inseticidas utilizados na cana-de-açúcar a adultos de *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Bioscience Journal** 29(5):1267-1274.

Parra JRP (1992) Situação atual e perspectivas do controle biológico, através de liberações inundativas, no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 27(13):271-279.

Parra JRP (2014) Biological control in Brazil: an overview. **Scientia Agricola** 71(5):420-429.

Parra JRP, Coelho Júnior A (2019) Applied biological control in Brazil: from laboratory assays to field application. **Journal of Insect Science** 19(2). doi.org/10.1093/jisesa/iey112.

Parra JRP, Botelho PSM, Correa-Ferreira BS, Bento JMS (2002) **Controle biológico no Brasil**: parasitóides e predadores. São Paulo: Editora Manole. 609 p.

Parra JRP, Zucchi RA (1997) ***Trichogramma* e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ. 324 p.

Pelizza SA, Schalamuk S, Simón MR, Stenglein SA, Pacheco-Marino SG, Scorsetti AC (2018) Compatibility of chemical insecticides and entomopathogenic fungi for control of soybean defoliating pest, *Rachiplusia nu*. **Revista Argentina de Microbiologia** 50(2):189-201.

Pereira-Barros JL, Broglio-Micheletti SMF, Santos AJND, Carvalho LWTD, Carvalho LHTD, Oliveira CJTD (2005) Biological aspects of *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared on eggs of *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Ciência e Agrotecnologia** 29(4):714-718.

Pinto AS, Garcia JF, Botelho PSM (2006) Controle biológico da cana-de-açúcar. In: Pinto AS, Nava DE, Rossi MM, Malerbo-Souza DT (Eds.) **Controle biológico de pragas na prática**. Piracicaba: CP2. 287 p.

Pinto JD (1997) Taxonomia de *Trichogramma*tidae (Hymenoptera) com ênfase nos gêneros que parasitam Lepidoptera. In: Parra JRP, Zucchi RA (Eds.) ***Trichogramma* e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ. p. 13-39.

Polanczyk RA, Alves SB (2003) *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociencia** 7(2):1-9.

Polanczyk, RA, Pratissoli, D, Dalvi, LP, Grecco, ED, Franco, CR (2010). Effect of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on the biological parameters of *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência e Agrotecnologia**, 34(6), 1412-1416.

Pratissoli D, Milanez AM, Barbosa WF, Celestino FN, Andrade GS, Polanczyk RA (2010) Side effects of fungicides used in cucurbitaceous crop on *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner (Hymenoptera: Trichogramatidae). **Chilean Journal of Agricultural Research** 70(2):323-327.

Queiroz AA, Martins JAS, Cunha JPAR (2008) Adjuvantes e qualidade da água na aplicação de agrotóxicos. **Bioscience Journal** 24(4):8-19.

Ribeiro RS (2014) **Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil**. 87 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia), ESALQ/USP, Piracicaba.

Russo J, Voegele J (1982) Effect of temperature on four *Trichogramma* species (Hymenoptera, Trichogrammatidae) parasites of the European corn borer, *Ostrinia nubialis* Hubn. (Lepidoptera, Pyralidae). II. Reproduction and survival time, biological control**. Agronomie** 2:517–524.

SAS Institute. SAS/STAT User`s Guide, version 9.00 TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC, 2015.

Sattelle DB, Cordova D, Cheek TR (2008) Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. **Invertebrate Neuroscience** 8(3):107-119.

Silva MF, Funichello M, Souza DM (2020) Performance of insecticides in control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane. **Arquivos do Instituto Biológico** 87:e0782018.

Simi LD (2010) **Susceptibilidade das fases do ciclo de vida de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) à ação de fungos entomopatogênicos**, 64 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), FCAV/UNESP, Jaboticabal.

Stouthamer R, Luck RF, Hamilton WD (1990) Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 87(7):2424-2427.

Subbanna ARNS, Stanley J, Venkateswarlu V, Naik VCB, Khan MS (2019) Toxicological prospects on joint action of microbial insecticides and chemical pesticides. In: Khan M, Ahmad W. (Eds.) **Microbes for sustainable insect pest management**. Sustainability in plant and crop protection. Cham: Springer. p. 317-340.

Trocska BJ, Williams AJ, Williamson MS, Field LM, Luemmen P, Davies TGE (2015) Stable expression and functional characterisation of the diamondback moth ryanodine receptor G4946E variant conferring resistance to diamide insecticides. **Scientific Reports** 5(1):1-11.

UNICA (2009) União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. A indústria da cana-de-açúcar: Etanol, açúcar e bioeletricidade. Disponível em: <http://www.portalunica.com.br>. Acesso em: 22 dez. 2020.

UNICA (2018) União da indústria de cana-de-açúcar. Dados e cotações. Disponível em:<http://www.unica.com.br/unicadata>. Acesso em: 20 jan. 2021.

Valente ECN, Broglio SMF, Passos EMD, Lima ASTD (2016) Desempenho de *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) sobre ovos de *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 51(4):293-300.

Volpe HXL (2014) **Métodos para avaliar a liberação e o parasitismo de *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) em cana-de-açúcar**. 84 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Entomologia Agrícola). FCAV/UNESP, Jaboticabal.

Waack RS, Neves MF, Moraes S, Marino M, Mamone A, Szasz A (1998) Competitividade do sistema agroindustrial da cana-de-açúcar. **Competitividade no agribusiness brasileiro: versão final** 5:1-194.

Wenzel IM, Giometti FHC, Almeida JEM (2006) Patogenicidade do isolado IBCB 66 de *Beauveria bassiana* à broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* em condições de laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico** 73(2):259-261.

Zappelini LO, Almeida JEM, Batista Filho A, Giometti FHC (2010) Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. visando o controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). **Arquivos do Instituto Biológico** 77(1):75-82.

Zibaee A (2019) Entomopathogen and synthetic chemical insecticide: synergist and antagonist. In: Khan M, Ahmad W (Eds.) Microbes for sustainable insect pest management. Sustainability in plant and crop protection. Cham: Springer. p. 341-363.

Zucchi RA, Monteiro RC (1997) O gênero *Trichogramma* na América do Sul. In: Parra JRP, Zucchi RA (Eds.) *Trichogramma* e o controle biológico aplicado. Piracicaba: FEALQ. p. 41-46.