

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP CÂMPUS
DE JABOTICABAL**

**COMPATIBILIDADE COM INSETICIDAS QUÍMICOS E
ENCAPSULAMENTO DE *Beauveria bassiana* PARA
CONTROLE DE *Sphenophorus levis***

Giovani Smaniotto
Engenheiro Agrônomo

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP CÂMPUS
DE JABOTICABAL**

**COMPATIBILIDADE COM INSETICIDAS QUÍMICOS E
ENCAPSULAMENTO DE *Beauveria bassiana* PARA
CONTROLE DE *Sphenophorus levis***

Discente: Eng. Agr. Giovani Smaniotto

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

**Tese apresentada à faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Campus de Jaboticabal, como
parte das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Agronomia
(Entomologia Agrícola).**

S635c	Smaniotto, Giovani Compatibilidade com inseticidas químicos e encapsulamento de <i>Beauveria bassiana</i> para controle de <i>Sphenophorus levis</i> / Giovani Smaniotto. -- Jaboticabal, 2019 89 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Ricardo Antônio Polanczyk Coorientador: Leonardo Fernandes Fraceto 1. Pragas Controle. 2. Fungos. 3. Microencapsulação. 4. Inseticidas. 5. Radiação ultravioleta. I. Título.
-------	--

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: COMPATIBILIDADE COM INSETICIDAS QUÍMICOS E ENCAPSULAMENTO
DE *Beauveria bassiana* PARA CONTROLE DE *Spehenophorus levis*

AUTOR: GIOVANI SMANIOTTO

ORIENTADOR: RICARDO ANTONIO POLANCZYK

COORIENTADOR: LEONARDO FERNANDES FRACETO

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

Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. ODAIR APARECIDO FERNANDES
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Dr. PAULO CESAR BOGORNI
BioPartner Agro Soluções / Piracicaba/SP

Pesquisador Dr. LUÍS GARRIGÓS LEITE
Instituto Biológico de Campinas / Campinas/SP

Prof. Dr. ROGÉRIO TEIXEIRA DUARTE
Departamento de Entomologia-UNIARA / Araraquara/SP

Jaboticabal, 29 de novembro de 2019

Dados Curriculares do autor

GIOVANI SMANIOTTO – Natural de Aratiba, RS, nascido em 29 de janeiro de 1990, filho de Idir Jose Smaniotto e Idianila Salete Smaniotto. Formado em Engenharia Agrônômica pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI – Campus de Erechim, no ano de 2013. Durante a graduação desenvolveu atividades na seleção de variedades de cana-de-açúcar com tolerância ao frio a serem indicadas para cultivo no estado do Rio Grande do Sul, sob orientação dos Professores Dr. Amito Teixeira e Dr. Sergio Antonio do Amaral, durante 3 anos da graduação. Estágio de conclusão de curso realizada na Embrapa Clima Temperado, Pelotas – Rio Grande do Sul, no Laboratório de Entomologia Agrícola sob a supervisão do Pesquisador Dr. Dori Edson Nava. No ano de 2014 deu início no Mestrado em Ciências (Entomologia) no Instituto Biológico da Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, sob orientação do Pesquisador Prof. Dr. Dori Edson Nava. Em março de 2016 iniciou Doutorado em Agronomia (Entomologia Agrícola) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho Jaboticabal, São Paulo, com bolsa CAPES, sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk. Possui experiência em criação de insetos, multiplicação de entomopatógenos, experimentação agrícola, controle biológico e manejo integrado de pragas.

**“Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que
deixa de existir”
(Esteve Jobs)**

Ofereço

**A meu pai Idir Smaniotto, minha
mãe Idianila Smaniotto
Meu Irmão Gian Smaniotto pela
educação exemplar que
recebi, pelo amor
incondicional, e por todo o
incentivo para chegar até
este momento**

Dedico

**A Minha esposa Samanta
Tozzi e meu filho Bernardo
Smaniotto, meus
companheiros inseparáveis**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde e força para completar mais este desafio em minha vida.

À minha família, em especial a minha mãe Idianila Salete Smaniotto, meu pai Idir Jose Smaniotto e meu irmão Gian Smaniotto pelo amor, carinho e apoio durante este período.

À minha amada esposa pelo amor, pela compreensão por estar a meu lado nos momentos bons e momentos maus.

Ao meu Filho, Bernardo, maior presente que a vida me deu.

Ao Seu Adão Avides e Dona Carmen Avides, por serem como pais para mim durante este período e pela grande amizade que será eterna.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk, pela orientação, ensinamentos, confiança, amizade, disposição em todos os momentos e pelo exemplo de ética e profissionalismo.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) pelos excelentes conhecimentos transmitidos durante o curso.

Ao meu coorientador Dr. Leonardo Fernandes Fraceto que sempre ajudou nas dúvidas que surgiram durante este período.

À equipe do Laboratório de Nanotecnologia Ambiental, no Instituto de Ciência e Tecnologia - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Sorocaba – SP pela ajuda nos experimentos e ensinamentos.

Aos amigos Helvio Campoy Junior e Mailson Pires, pela disponibilidade de produtos para a realização dos experimentos.

Ao Instituto Biológico em especial ao Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida pela disponibilidade do isolado do fungo testado.

À Usina São Martinho, em especial a Aimeé Regali Seleglim, por disponibilizar áreas para a realização de coletas de *Sphenophorus levis*

Ao colega e amigo Gilmar da Silva Nunes, pelo auxílio na elaboração deste manuscrito

Aos amigos e colegas do Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas, Kelly Cristina Gonçalves, Matheus Henrique Guarita Tozzi Borges, Joacir do Nascimento, Igor Sena, Naymã Dias e o Técnico do Laboratório Wilson Pazzini pela amizade e disponibilidade quando necessário.

Ao Professor Dr. Sergio Antonio de Bortoli, por disponibilizar as dependências do Laboratório de Biologia e Criação de Insetos por determinado período e pelos conselhos profissionais e pessoais.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biologia e Criação de Insetos, Natalia Alves dos Santos, Damara Gomes Ramalho, Gilmar da Silva Nunes, Caroline Placidi de Bortoli, Rafael Ferreira dos Santos, Matheus Moreira Dantas Pinto, Lauany Cavalcante, Natalia Fernanda Vieira, Caio Cezar Truzzi, Camila Pires Cardoso, Gustavo Oliveira de Magalhães.

Ao colega e amigo Cícero Antônio Mariano dos Santos pela ajuda quando se fez necessária.

A todos os colegas e amigos de pós-graduação que de alguma forma contribuíram para minha formação.

A todos os funcionários e demais estudantes do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola - Unesp Jaboticabal, pela amizade e bom convívio.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a qual quero deixar aqui meu agradecimento pela concessão da Bolsa.

Por fim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Muito Obrigado!!

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
CAPITULO 1 - Considerações gerais	4
1 - INTRODUÇÃO	4
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1 - Cultura da Cana-de-açúcar.....	6
2.2 - <i>Sphenophorus levis</i> Vaurie	7
2.2.1 - Distribuição e bioecologia.....	7
2.2.2 - Monitoramento e controle	10
2.3 - <i>Beauveria bassiana</i>	13
2.4 - Uso de técnicas de encapsulamento de fungos.....	16
2.5 - Compatibilidade de inseticidas químicos com fungos entomopatogênicos	20
3 - REFERÊNCIAS.....	22
CAPITULO 2 - Avaliação do efeito da radiação UV em <i>Beauveria bassiana</i> encapsulada e patogenicidade a <i>Sphenophorus levis</i>	36
RESUMO -	36
ABSTRACT -	37
1 - INTRODUÇÃO	38
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	40
2.1 - Obtenção e criação de <i>Sphenophorus levis</i> e do isolado de <i>Beauveria bassiana</i>	40
2.2 - Encapsulamento de Isolados de <i>Beauveria bassiana</i>	42
2.3 Patogenicidade de <i>Beauveria bassiana</i> a <i>Sphenophorus levis</i>	42
2.4 Efeitos da radiação ultravioleta em <i>Beauveria bassiana</i> encapsulada e não encapsulada	43
2.5. Análise estatística.....	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
4 – CONCLUSÕES	50
5 - REFERÊNCIAS.....	51
CAPITULO 3 - COMPATIBILIDADE IN VITRO DE INSETICIDAS REGISTRADOS PARA O CONTROLE DE PRAGAS DE SOLO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM <i>Beauveria bassiana</i>	56

RESUMO -	56
ABSTRACT -	57
1 - INTRODUÇÃO	58
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	60
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
4 - CONCLUSÃO.....	72
5 - REFERÊNCIAS.....	73

COMPATIBILIDADE COM INSETICIDAS QUÍMICOS E ENCAPSULAMENTO DE *Beauveria bassiana* PARA CONTROLE DE *Sphenophorus levis*

RESUMO - A cana-de-açúcar possui grande destaque no cenário econômico mundial, por ser matéria prima para a produção de açúcar, etanol e uma diversidade de produtos secundários. Esta cultura vem se expandindo para novas áreas agricultáveis do Brasil e consequentemente fatores que limitam a produtividade também se fazem presente. Um dos fatores limitantes são os insetos-pragas. Para cana-de-açúcar estima-se que existam aproximadamente 80 espécies de insetos causando danos. Dentre estas espécies, *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) é a principal praga de solo, causando perdas significativas na produção. O uso de fungos entomopatogênicos tem se mostrado promissor para o controle deste inseto-praga. Dentre estes fungos, *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) se apresenta como um agente promissor para o controle desta praga; porém é suscetível a fatores abióticos, como radiação UV, que reduzem a sua eficiência em campo. Outro fator limitante ao uso deste agente é a falta de conhecimento em relação compatibilidade com inseticidas químicos. Estas informações são úteis para o uso associado destes dois métodos de controle. Tendo em vista estas problemáticas, o presente estudo teve como objetivo realizar testes de compatibilidade com inseticidas químicos e o encapsulamento de um isolado de *B. bassiana* para diminuir os efeitos da radiação UV. O encapsulamento do fungo foi realizado pelo método de gelificação iônica, com uma suspensão de alginato de sódio contendo o fungo em uma solução de cloreto de cálcio. O teste de patogenicidade foi realizado com partículas secas e úmidas, sendo divididas em duas quantidades 0,05 e 0,1 g, fungo não encapsulado também foi utilizado para o teste. Para avaliação dos efeitos da radiação UV, o fungo encapsulado e não encapsulado foi exposto a radiação UV-A e UV-B em diferentes tempos (0, 30, 60, 120, 240, 480 e 720 minutos), após 7 dias o crescimento das colônias foi mensurado. Nos testes de compatibilidade *in vitro*, 13 inseticidas foram testados em três doses (mínima, média e máxima) com a mistura destes ao meio de cultura ainda líquido e sua transferência para Placa de Petri, onde uma alíquota de 5 µL do fungo foi inoculada no centro da placa. O material foi acondicionado em B.O.D e sete dias depois foram avaliados os parâmetros crescimento vegetativo, esporulação e viabilidade de conídios. Para determinar a compatibilidade entre os inseticidas e *B. bassiana* foi utilizada uma fórmula matemática da compatibilidade de produtos fitossanitários e entomopatógenos. O fungo não encapsulado causou mortalidade de 100% dos insetos, já o fungo encapsulado a mortalidade observada foi 60 % para partículas úmidas nas duas quantidades usadas, sendo que 75% dos insetos mortos houve esporulação do fungo. Já para as partículas secas a mortalidade foi de 30% para 0,05 g com 25% dos insetos mortos apresentando esporulação do fungo e 40% de

mortalidade com a quantidade de 0,01 g de partículas com 83,3% dos insetos mortos apresentando esporulação do fungo. Quanto a radiação UV os tempos de exposição 30 e 480 minutos, o fungo não encapsulado apresentou maior tamanho de colônia. O isolado testado apresentou capacidade de restaurar o crescimento depois de afetado pela radiação UV. O inseticida Evidence® 700 inibiu o desenvolvimento do fungo nos parâmetros avaliados. O crescimento vegetativo e a esporulação apresentaram variação entre as doses testadas de cada produto. A germinação de conídios foi inversamente proporcional com a dose de cada produto testado. Somente os inseticidas Singular® e Diamante® foram compatíveis com o isolado de *B. bassiana* na dose recomendada, enquanto o primeiro foi compatível no dobro da dose recomendada.

Palavras-chave: Controle microbiano, inseticidas, MIP, radiação UV

COMPATIBILITY WITH CHEMICAL INSECTICIDES AND *Beauveria bassiana* ENCAPSULATION FOR CONTROL OF *Sphenophorus levis*

ABSTRACT - Sugarcane has great prominence in the economic scenario worldwide, for being raw material to produce sugar, ethanol, and diversity of secondary products. This culture has been expanding to new agricultural areas in Brazil and, consequently, factors limiting productivity are present as well. One of the limiting factors is insect-pests. To estimate the amount of sugarcane in existence, approximately 80 insect species cause damage. Among these species, *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) is one of the main soil pests, which leads to production losses. The use of entomopathogenic fungi is promising for controlling this pest. Among entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae), present itself as a promising agent for the control of this pest; however, it may be susceptible to abiotic factors such as UV radiation, which affect its efficiency under field conditions. Another limiting factor to the use of this agent is the lack of knowledge regarding the compatibility with chemical insecticides. This information is useful for the use of both control methods. Given these problems, the present study aimed to encapsulate a *B. bassiana* isolate to reduce the effects of UV radiation and compatibility with chemical insecticides. The encapsulation of the fungus was performed by the ionic gelation method, with a suspension of silicon alginate, or the fungus in a calcium chloride solution. Pathogenicity test was performed with dry and wet particles divided into two doses of 0.05 and 0.1 g, and the unencapsulated fungus was also used for testing. To assess the effects of UV radiation, both encapsulated and unencapsulated fungus were exposed to UV-A and UV-B radiation at different times (0, 30, 60, 120, 240, 480 and 720 minutes), and after 7 days the growing colonies were measured. In vitro compatibility tests, 13 insecticides were tested at three doses (minimum, medium and maximum) with a mixture of these two still liquid culture methods, and their transfer to Petri dish, where a 5 µL aliquot of the fungus was inoculated into the center of the dish. The material was stored in B.O.D and seven days later, vegetative growth, sporulation, and conidia viability were calculated. To determine the compatibility between insecticides and *B. bassiana*, a mathematical formula for the compatibility of phytosanitary and entomopathogenic products was used. The unencapsulated fungus caused 100% insect mortality, whereas encapsulated fungus caused 60% mortality. Two samples were used, and 75% of the dead insects had sporulation of the fungus. For dry particles, mortality rate was 30% to 0.05 g with 25% dead insects, sporulation of fungi and 40% with the amount of 0.01 g of enamel with 83.3% dead insects of fungus sporulation. As for UV radiation at exposure times 30 and 480 minutes, unencapsulated fungus presented larger colony size. The isolate tested shows the ability to repair its growth after the damage caused by UV radiation. Insecticide Evidence® 700 inhibited fungal development at the specified parameters. Vegetative growth and sporulation varied among the tested doses of each product. A conidial germination was inversely proportional to the dose of each product tested. Both Singular® and Diamante® insecticides were

compatible with the recommended *B. bassiana* dose, only, and the first was compatible with twice the recommended dose.

Keywords: Microbial control, insecticides, IPM, UV radiation

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar, *Saccharum spp*(L.) (Poaceae), é uma planta de clima tropical com grande importância socioeconômica para o Brasil, uma vez que é a principal matéria-prima para a produção de açúcar e etanol no país. Além disso, é a terceira cultura com maior área de produção, após a soja (*Glycine max*) (Fabaceae) e o milho (*Zea mays*) (Poaceae). Assim, o país é o principal produtor mundial da cultura (FNP Consultoria e Comércio, 2015).

Devido a expansão do cultivo, vários fatores têm afetado a produção de cana-de-açúcar no Brasil e dentre eles destacam-se os insetos-praga, dos quais estima-se que existam aproximadamente 80 espécies causando danos a cultura (Pinto, 2006; Borges Filho et al., 2019). Na cultura da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) é a principal praga de solo, podendo causar perdas anuais entre 20 a 30 toneladas além de provocar a morte de 50 a 60% dos perfilhos ainda na fase de cana-planta e/ou com cinco a sete meses de crescimento (Terán e Precetti, 1982; Precetti e Arigoni, 1990; Polanczyk et al., 2004; Girón-Pérez et al., 2009; Almeida e Almeida, 2015).

Segundo Kogan (1998), para reduzir os prejuízos causados por insetos-pragas é importante a implementação de um programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP), que compreende a adoção de medidas de controle, isoladas ou em associação, levando-se em consideração a relação custo/benefício e os impactos na sociedade e no ambiente que estas medidas causaram. O método de ataque simultâneo ou “ataque duplo” ao inseto alvo, por diferentes agentes de controle, se apresenta promissor para o manejo e controle de *S. levis*, bem como para outras espécies de insetos-pragas. Essa abordagem de “ataque duplo” pode resultar em índices maiores de mortalidade do alvo em relação ao uso de qualquer um desses métodos de forma independente ou isolada (Hiromori e Nishigaki, 2001; Bitsadze, et al. 2013). Para obtenção de resultados satisfatórios, a abordagem combinada para melhorar o controle de pragas requer

uma melhor compreensão dos mecanismos e sinergismo dos métodos a serem utilizados, bem como proteção de agentes de controle biológico quando aplicados isoladamente.

Tendo em vista que o uso de técnicas associadas ou isoladas podem auxiliar no manejo de controle de *S. levis* na cultura da cana-de-açúcar, o presente estudo teve como objetivos: Verificar a compatibilidade de inseticidas utilizados cultura da cana-de-açúcar e o agente de controle *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 (Ascomycota: Hypocreales) e utilizar a técnica de encapsulamento desse agente de biocontrole visando prolongar sua vida útil no campo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura da Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar possui grande destaque no cenário econômico mundial, uma vez que é fonte de recursos para a população. Açúcar, álcool, vinhaça, melaço, aguardente e o bagaço são os principais produtos e subprodutos economicamente importantes oriundos da cultura (Lopes et al, 2011).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido por Índia, China, Tailândia e Paquistão (FAO, 2017). Estima-se que a produção brasileira para a safra 2019/2020 seja de aproximadamente 8,4 milhões de hectares, com produção próxima a 620 milhões de toneladas. As regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste são consideradas as maiores produtoras da cultura. O estado de São Paulo lidera a produção nacional da cana, com aproximadamente 4,2 milhões de hectares estimados para a safra 2019/2020, o que corresponde a aproximadamente 50% da área cultivada no País (CONAB, 2019). A cultura canavieira é a principal responsável pelo abastecimento das indústrias de açúcar e álcool, sendo responsável por mais de 40% do mercado mundial de álcool, constituindo o maior programa de combustível renovável do planeta (Cícero et al, 2009).

A cana-de-açúcar é uma planta que apresenta perfilhamento, o qual define a capacidade que cada variedade tem de rebrotar através das gemas não brotadas dos colmos cortados (Scarpari e Beauclair, 2008). Este perfilhamento, bem como o rebrote da cultura, pode ser afetado por fatores abióticos (luz, temperatura, umidade do solo e nutrientes), assim como outros fatores que também podem ser determinantes para um bom rebrote da planta, tais como espaçamento, profundidade e época de plantio, época de corte e controle de insetos-pragas e doenças (Alexander, 1973).

Dos fatores mencionados anteriormente, os insetos-pragas têm causado danos na capacidade de rebrota da cana, bem como na sua produtividade. Na medida em que a cultura se expande para novas áreas ocorre um consequente aumento proporcional de problemas relacionados aos insetos-pragas (Almeida, 2005). Estima-se que existam aproximadamente 80 espécies de insetos que

utilizam a cana-de-açúcar como fonte de alimento e, dessa interação, perdas consideráveis na produtividade da cultura podem ser detectadas, em geral 20% (Pinto, 2006; Santiago e Rosseto, 2008).

Dentre as espécies de insetos-praga que atacam a cana-de-açúcar, os insetos de hábitos predominantemente edáficos são os que apresentam maior dificuldade de controle, por estarem protegidos na camada de palha e no solo. Em função destes hábitos, a visualização não é possível ou muito rara, só podendo ser detectada a presença dos mesmos a partir dos sintomas ou danos causados às plantas (Dinardo-Miranda, 2008). *Sphenophorus levis* tem-se tornado a principal praga edáfica da cana-de-açúcar e vem sendo considerado um fator limitante para a produção, devido ao seu alto potencial de dano e difícil controle (Dinardo-Miranda, 2014).

2.2. *Sphenophorus levis* Vaurie

2.2.1. Distribuição e bioecologia

Insetos do gênero *Sphenophorus* (Coleoptera: Curculionidae) são registrados em diversos continentes, tendo como principais hospedeiros espécies de plantas pertencentes ao grupo das gramíneas (Poaceae). O maior número de espécies do gênero está registrado na América do Norte (75 espécies), onde acredita-se que seja a origem do gênero. Outras seis espécies são registradas na Europa, África do Norte e Ásia, e 26 nas outras regiões da África e do Pacífico (Leite et al., 2005). Na América do Sul são registradas 18 espécies distribuídas pela Argentina, Uruguai, Brasil (Vaurie, 1978) e Paraguai (Zarbin et al. 2003). No Brasil são registradas 14 espécies do gênero, dentre estas destaca-se *S. levis*, a qual também é relatada na Argentina, Uruguai e Paraguai (Zarbin et al. 2003). O bicudo da cana-de-açúcar foi relatado pela primeira vez em 1977 no município de Santa Bárbara do Oeste, São Paulo, sendo descrito como nova espécie em 1978 (Vanin, 1990). Posteriormente, foi relatado nos estados do Paraná, Santa Catarina (Precetti e Arrigoni, 1990), Minas Gerais (Girón-Pérez, 2009) e Mato Grosso do Sul (Moraes e Ávila, 2013) causando perdas significativas e até mesmo a inviabilidade dos canaviais atacados.

Apesar de ser uma praga com alto potencial de dano, *S. levis* apresenta uma baixa capacidade de dispersão. Seu deslocamento é basicamente por caminhamiento, já que apresenta uma capacidade de voo restrita e pouco comum (Precetti e Arrigoni, 1990). A dispersão por caminhamiento é de aproximadamente 3 metros/dia para fêmeas e 5 metros/dia para machos (Precetti e Teran, 1983). Estas informações reforçam a hipótese que este inseto é beneficiado pelo transporte de mudas infestadas com formas biológicas (ovos, larvas e pupas) do mesmo para áreas livres de sua ocorrência, contribuindo para a disseminação da espécie (Dinardo-Miranda, 2000).

Este inseto-praga tem se apresentado como um fator limitante para a produção de cana-de-açúcar na grande maioria das regiões produtoras da cultura, devido ao seu alto potencial de dano que leva a perdas significativas na produção. No Estado de São Paulo é considerado uma das pragas mais relevantes para a cana-de-açúcar (Dinardo-Miranda, 2014).

De acordo com Degaspari et al. (1987) o ciclo biológico do bicudo em condições de laboratório varia de 58 a 307 dias, com média de 173,2 dias, sendo as fêmeas mais longevas (174,9 dias em média) que os machos (171,1 dias em média), podendo ocorrer até cinco gerações anuais. Os adultos apresentam variação de comprimento na faixa de 12 a 15 mm. Sua coloração é marrom escura com manchas pretas sobre o dorso e a face ventral é preta; são encontrados geralmente no solo, sob torrões, restos vegetais ou entre os perfilhos na base da touceira da cana. Esses insetos apresentam hábito noturno, pouca agilidade e comportamento de tanatose (quando tocados simulam estar mortos) (Precetti e Teran, 1983; Precetti e Arrigoni, 1990).

As fêmeas realizam a postura na base das brotações após raspar a casca do colmo utilizando seu aparelho bucal. De acordo com Barreto-Triana et al. (2009) o acasalamento ocorre em qualquer período do dia, sendo que o período estimado entre 21 e 35 dias após a emergência é considerado ideal para a reprodução e acasalamento da espécie. Cada fêmea tem capacidade média de ovipositar 40 ovos, podendo chegar ao máximo de 70 ovos; deste montante, 75% são depositados na primeira metade de vida do inseto (Degaspari et al., 1987; Precetti e Arrigoni, 1990). De acordo com Pinto et al. (2009) o adulto tem

atratividade por solos claros, argilosos e com boa umidade. Os ovos apresentam forma elíptica com coloração branco leitosa, escurecendo na medida que se aproxima a eclosão da larva. O período de incubação é em média de 8,4 dias com variação de 7 a 12 dias. (Degaspari et al., 1987).

Ao eclodirem, as larvas apresentam coloração branco leitosa, que vai evoluindo para uma coloração mais amarelada de acordo com seu desenvolvimento; são ápodas e enrugadas, apresentam mancha marrom no primeiro segmento torácico e a cabeça é castanho avermelhada. As larvas são altamente sensíveis ao calor e a desidratação, têm hábito subterrâneo, onde se alimentam do colmo da planta. Quando aproximam-se da fase de pupa, ampliam a galeria no colmo e preparam uma câmara pupal, cessam os movimentos e a alimentação (Degaspari et al., 1987). O período larval médio é de 50 dias e as larvas são mais abundantes na época seca do ano, com pico populacional entre junho e julho (Precetti e Teran, 1983; Precetti e Arrigoni, 1990). A fase de pupa é de aproximadamente 10 dias, e as pupas permanecem no interior do colmo. As pupas são inicialmente branco leitosas, do tipo exarada, tornando-se castanho-claras com manchas dorsais após a esclerotização e tendo seu pico populacional no mês de dezembro (Precetti e Teran, 1983; Degaspari et al., 1987; Precetti e Arrigoni, 1990).

As larvas de *S. levis* são as responsáveis pelos danos consideráveis à cultura, isso porque elas constroem galerias que danificam os tecidos no interior das bases dos perfilhos, conseqüentemente, levam à morte da planta, ou ocasionam falhas na brotação de soqueiras. Também, pode ser observado um aumento na proliferação de plantas daninhas, ocupando o espaço deixado pela falha no perfilho (Precetti e Arrigoni, 1990). O sintoma de ataque se manifesta geralmente na época seca do ano, pois as larvas, ao se alimentarem dos rizomas, provocam o aparecimento de brotos amarelos, falhas na rebrota das soqueiras, podendo, de acordo com o grau de infestação na cultura, causar a morte da cana em certos casos (Degaspari et al., 1987).

Os danos interferem diretamente no número, tamanho e diâmetro de colmos para a colheita, causando a redução da produção de toneladas de cana por hectare. Em alguns locais, têm-se detectado de 50 a 60% de perfilhos

atacados, ocasionando reduções de 20 a 30 toneladas por hectare (Pinto et al., 2009). De acordo com Dinardo-Miranda (2014), infestações elevadas de *S. levis* são comuns em canaviais mais velhos (cana soca), porém o ataque pode ocorrer logo na cana-planta, sendo necessário realizar a reforma do canavial, em casos extremos, logo após o primeiro corte.

Um dos fatores que pode ter contribuído para o aumento, de forma drástica, de populações do bicudo da cana, foi a adoção da colheita crua da cana-de-açúcar, pois quando as queimadas eram realizadas, a fase adulta da espécie de ocorrência na área era controlada pela ação do fogo. Com a proibição das queimadas para a colheita da cana, além de não ocasionar morte e redução de infestações dos insetos adultos, a palha remanescente no campo passou a servir de abrigo, proteção e um ambiente favorável ao seu desenvolvimento (Dinardo-Miranda e Fracasso, 2013).

2.2.2. Monitoramento e controle de *S. levis*

A identificação de áreas infestadas por *S. levis* para aplicações de técnicas de controle, podem ser realizadas de duas maneiras: a partir do levantamento das fases imaturas do inseto e pelo monitoramento da fase adulta. Para o monitoramento das fases imaturas (larva e pupa) adota-se o método desenvolvido pelo Centro de Tecnologia Canavieiro (CTC). Este método consiste na abertura de duas trincheiras (0,5 m × 0,5 m × 0,3 m) por hectare e na coleta das formas imaturas presentes em cada ponto (Almeida e Stingel, 2005). Além disso, este método deve ser realizado nos meses de maio a setembro, período no qual ocorre a maior incidência destas fases no campo.

O monitoramento da fase adulta é realizado mediante uso de iscas tóxicas, seguindo a metodologia proposta por Precetti e Arrigoni (1990). Estas iscas são produzidas a partir de toletes de cana, com tamanho aproximado de 30 cm, cortados longitudinalmente, embebidos em solução de inseticida com melaço e posteriormente distribuídos na base das touceiras em número de 100 a 300 toletes por hectare, cobertas com palha e avaliadas após 15 dias da distribuição. O uso deste método deve ser realizado de outubro a março, período no qual ocorre a maior incidência da fase adulta do inseto. Este levantamento é recomendado para áreas de viveiro a fim de prevenir a liberação

de mudas infestadas por *S. levis* (Precetti e Arrigoni, 1990; Dinardo-Miranda, 2014).

O controle de *S. levis* é baseado no uso de conjunto de medidas que devem ser adotadas nas áreas infestadas. Medidas como, controles mecânicos, culturais, químicos e biológicos podem ser utilizadas de forma simultânea para apresentar melhores resultados no controle da praga, pois o uso isolado destas medidas pode não ser eficaz no controle. Os controles cultural e químico são os mais utilizados no controle desta praga. (Dinardo-Miranda, 2000; 2008). Outros métodos de controle que têm mostrado resultados interessantes para no manejo do bicudo da cana é o controle biológico com uso de entomopatógenos, plantas resistentes e feromônio sexual (Degaspari et al., 1987; Precetti e Arrigoni, 1990; Polanczyk, et al., 2004; Giometti et al. 2011 Leite et al. 2012; Simi, 2014).

O nível de dano econômico desta praga para a cultura da cana-de-açúcar ainda não é completamente estabelecido, provavelmente, por diversos fatores como a baixa eficiência no controle, a severidade nos danos causados pela praga e pela dificuldade da criação do inseto em laboratório para realização de estudos básicos. Dessa forma, o controle desta praga é realizado baseando-se no histórico de ocorrência e dos danos da praga possíveis de serem observados (Dinardo-Miranda, 2014).

Entre os métodos culturais de controle de *S. levis*, o mais utilizado é o mecânico. Este processo consiste na destruição da soqueira na reforma a área infestada. Quando ocorre a destruição mecânica da touceira as formas imaturas da praga são expostas a predadores e ação do sol, o qual causa a morte por desidratação das larvas e pupas. No entanto recomenda-se a realização deste método nas épocas de ocorrência das formas jovens sendo recomendado apenas para áreas que serão destinadas a reforma, pois esta técnica é destrutiva (Precetti e Arrigon, 1990; Pavlu, 2012). Outra recomendação é a eliminação de plantas daninhas que podem servir de alimento alternativo para larvas (Precetti e Arigoni, 1990). Entretanto, essa prática apresenta resultado satisfatório somente para áreas de cana planta (1º corte), pois as larvas e, em muitos casos, as formas adultas do inseto conseguem sobreviver alimentando-se da matéria

orgânica deixada no campo após a destruição das soqueiras (Almeida, 2005; Giometti, 2009).

A utilização de iscas tóxicas com inseticida foi amplamente efetuada na década de 1980 e início da década de 1990; porém, devido ao alto custo relacionado a mão de obra, esta técnica tem sido utilizada exclusivamente para monitoramento de áreas com histórico de ocorrência da praga (Pavlu, 2012). O uso de inseticidas químicos para o controle de *S. levis* é feito basicamente de duas maneiras, a primeira é no momento do plantio, onde recomenda-se aplicação de fipronil (Regent 800 WG) (250 g/ha); a segunda é no corte de soqueira, onde o inseticida é aplicado diretamente no corte. Entretanto, apesar de todas essas medidas, ainda ocorre incremento nas populações da praga, sendo frequentes os registros de novas áreas infestadas. Isso demonstra a dificuldade de controle desse inseto e ressalta-se a importância da continuidade de pesquisas na busca de alternativas mais eficazes (Leite et al., 2006).

Apesar de ser uma praga de grande importância para o setor sucroalcooleiro brasileiro, até o ano de 2011 não havia nenhum inseticida registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para controle de *S. levis* (Giometti et al., 2011). Já no ano de 2015 estavam disponíveis cinco produtos registrados, um biológico (Bio nep steinernema®) e quatro formulações de inseticidas: lambdacialotrina + tiametoxan (Engeo Pleno®), alfa-cipermetrina + fipronil (Regent Duo®), bifentrina + carbosulfano (Talisman®), imidacloprido (Imidacloprid Nortox®) (Alencar, 2016). Atualmente, o número de produtos registrado para controle de *S. levis* aumentou para 10; porém, todos os produtos registrados para a praga são formulações químicas: fipronil (Albatross®), clorantraniliprole (Altacor®), bifentrina (Capture® 400 EC), alfa-cipermetrina + fipronil+ piraclostrobina (Muneo®) e imidacloprid (Warrant® 700 WG) (AGROFIT, 2019).

Mesmo tendo diversos inseticidas registrados para o controle da praga, na prática não se tem alcançado grande sucesso. A baixa eficácia do uso de inseticidas pode estar atrelada ao comportamento e hábito de larvas e adultos do inseto, os quais dificultam o contato desses produtos (Precetti; Arrigoni, 1990). Além dos produtos já registrados, Dinardo-Miranda e Fracasso (2010)

relataram os inseticidas Fipronil e Fipronil+Carbofuram como promissores para o controle de *S. levis* em cana planta.

O controle biológico de *S. levis* tem se concentrado no uso de entomopatógenos, uma vez que não se tem registro de predadores e parasitoides para esta espécie. Estudos visando o uso de nematoides entomopatogênicos para controle desta praga vêm apresentado-se promissores (Leite et al., 2006; Tavares et al. 2007; Giometti, 2009; Giometti et al. 2011 Leite et al. 2012). Contudo, alguns destes estudos precisam ser realizados a nível de campo. Os efeitos de bactérias entomopatogênicas, principalmente *Bacillus thuringiensis* (Bt), foram estudados sobre larvas de *S. levis* e têm revelado resultados promissores para o controle desta praga (Polanczyk et al., 2004; Cicero et al., 2009). O uso de fungos entomopatogênicos também tem se apresentado promissor para o controle dessa praga. Badilla e Alves (1991) utilizaram iscas tóxicas com o entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) e obtiveram resultados de mortalidade da população testada próxima a 92%. Simi (2014) testou isolados de *B. bassiana* e de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) e os resultados mostraram mortalidade próxima de 80%. Estudos mostram que estes fungos foram eficazes no controle de *S. levis* em campo, quando aplicados na forma líquida ou granulada; entretanto, *M. anisopliae* apresentou um período residual mais longo do que *B. bassiana*, garantindo um melhor controle da praga (Delfanti, 2012; Pagliarani, 2012; Salvador Neto, 2012).

2.3. *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana destaca-se entre as espécies de fungos entomopatogênicos mais promissores para o controle de pragas na cultura da cana-de-açúcar. Este entomopatógeno apresenta ampla gama de hospedeiros que, frequentemente, leva à ocorrência de epizootias naturais, tendo a infecção do inseto por contato como uma das principais características (Vega et al., 2009). A importância deste agente de controle microbiano de insetos é datada desde o início da história da patologia, quando foi observado pela primeira vez em criação de *Bombix mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). A partir daí, vem sendo utilizado

até os dias atuais como uma ferramenta para o controle biológico de pragas de alta importância agrícola e vetores de doenças de animais (Alves, 1998; Fan et al., 2011). A ocorrência natural de *B. bassiana* em mais de 700 espécies de hospedeiros tem sido documentada, concentrando-se os estudos principalmente em pragas agrícolas e em seus inimigos naturais (Inglis et al., 2001; Santos et al. 2002; Meyling e Eilenberg, 2006; Pedroso, 2014; Rossoni et al., 2013; Prestes et al., 2015).

O mecanismo de infecção de *B. bassiana* em insetos ocorre via cutícula. A adesão de conídios sobre a cutícula ocorre passivamente através de interações eletrostáticas. Após o contato, inicia-se o processo de germinação dos conídios. Posteriormente, os apressórios são formados, estes iniciam um processo de secreção de enzimas hidrolíticas que irão degradar a cutícula do inseto e favorecem a penetração das hifas. Uma vez dentro do hospedeiro, o micélio se ramifica dando origem a blastósporos leveduriformes (Goettel e Inglis, 1997; Sosa-Gomez et al., 1997; Bittencourt et al., 1999; Arruda et al., 2005; Hartelt et al., 2008).

O período para ocorrer a morte do hospedeiro infectado por fungos entomopatogênicos é de até 10 dias e está ocorre pela combinação da ação de toxinas fúngicas, obstrução física da circulação, diminuição da nutrição e pela invasão dos órgãos. Após a morte do hospedeiro, o fungo cresce na parte externa do cadáver e esporula. Para que ocorra a esporulação do fungo no cadáver hospedeiro é necessário que condições de temperatura e umidade sejam favoráveis ao seu desenvolvimento (Goettel e Inglis 1997: Hartelt et al., 2008; Angelo, 2011).

Os estudos detalhados sobre *B. bassiana* foram os pioneiros para patógenos em insetos, os quais foram desenvolvidos pelo italiano Agostino Bassi. Considerado um entomopatógeno generalista, *B. bassiana* é encontrado com frequência sobre insetos e amostras de solo, e apresenta patogenicidade para diferentes ordens de insetos, tais como Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Isoptera e Diptera (Watson et al., 1995; Alves, 1998; Bidochka et al., 1998; Meylinge e Einlenberg, 2006; Meyling e Einlenberg, 2007; Zimmermann, 2007; Svedese et al., 2012; Pinto et al., 2013; Ribeiro, 2013; Silva, 2014; Prestes

et al., 2015; Zambiazzi et al., 2016; Canali, 2017) e em ácaros e carrapatos bovinos (Tamai et al., 1999; Oliveira et al., 2002 Dos Santos et al., 2016; Bernardo, 2016; Klein, 2017).

Por apresentar característica de patogenicidade à diversas espécies de insetos e ácaros, este fungo tem grande potencial para ser utilizado em sistemas de MIP. No entanto, por ser um agente aplicado a nível de campo está sujeito a sofrer influência de fatores bióticos (produtos fitossanitários) e abióticos (temperatura, umidade e radiação ultravioleta, fatores relacionados ao hospedeiro, temperatura e composição química das secreções produzidas pela cutícula) que afetam a sobrevivência, viabilidade de conídios, desenvolvimento do fungo e infecção dos hospedeiros. (Abreu et al., 1983; Braga et al., 2001b Rangel et al 2008; Fernandes e Bittencourt, 2008; Polar et al., 2015). Dentre os fatores abióticos, o que apresenta maior importância é a radiação ultravioleta, pois esta causa aquecimento e dessecação do conídio, além de provocar danos irreversíveis ao DNA, proteínas, biomembranas, RNA, ribossomos e mutações. Estes danos influenciam diretamente na germinação e causam a inativação dos conídios, conseqüentemente, reduzem a sua atividade inseticida (Fargues et al., 1996; Braga et al., 2001c; Rangel et al., 2006; Chelico; Khachatourians, 2008; Hideg et al., 2013 Braga et al., 2015). A radiação UV-B, quando absorvida diretamente pelo DNA, causa a formação de dímeros de pirimidina e mutagênese, por outro lado a radiação UV-A ocasiona danos oxidativos e, indiretamente, danos ao DNA por fotossensibilização e formação de formas reativas de oxigênio (Friedberg et al., 1995). Todavia, a produção de melanina por fungos entomopatogênicos é um mecanismo de proteção e reparo aos danos causados pela radiação UV por meio de absorção de comprimentos de onda do espectro solar, inclusive a radiação UV (Butler e Day, 1998; Shang et al., 2012).

Estudos sobre efeitos da luz ultravioleta, em fungos entomopatogênicos, concentram-se em duas áreas: estímulo à esporulação e efeitos letais da luz UV-B (Valle, 1984; Leach, 1965; Braga et al., 2001a). Com o intuito de descobrir isolados de fungos resistentes ou tolerantes a radiação UV, diversos trabalhos foram desenvolvidos em vários grupos de pesquisas pelo mundo (Hunt et al., 1994; Inglis et al., 1995; Fargues et al., 1996; Inglis et al., 1997; Fourtouni et al., 1998; Cagan e Svercel, 2001; Braga et al., 2001a; Braga et al., 2002; Rangel et

al., 2005; Fernandes et al., 2007; Taylor et al., 2013). Porém, os estudos dos efeitos de fatores abióticos que limitam a eficiência de fungos entomopatogênicos não se restringem somente à radiação, outros fatores como altas temperaturas (Xie et al., 2012); aumentos bruscos de temperatura (Richter et al., 2010); calor e alta umidade e baixa umidade associada a altas temperaturas (Setlow e Setlow, 1996) também promovem danos ao DNA de microrganismos. A temperatura em conjunto com à radiação UV apresentam grande importância para falha em programas de controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos (Rangel et al., 2005). Portanto, estudos que apontem isolados mais tolerantes às condições adversas presentes no ambiente onde destina-se a aplicação de bioprodutos, são importantes para a disseminação desse tipo de controle, assim como o uso de técnicas de encapsulamento, que podem favorecer o prolongamento da vida útil e a persistência a nível de campo destes agentes de controle biológico, reduzindo os efeitos causados por estes fatores.

2.4. Uso de técnicas de encapsulamento de fungos

O encapsulamento é uma tecnologia que permite envolver um ingrediente ativo e outros agentes de controle, como os biológicos, com o auxílio de materiais visando a proteção contra a radiação ultravioleta, altas temperaturas e baixa umidade relativa (Vemmer e Patel, 2013). Em alguns casos, é possível desenvolver, inclusive, sistemas de liberação controlada do agente de controle. A partir dos anos 70, formulações com capacidade de liberação de inseticidas com alta massa molecular foram desenvolvidas, principalmente para o encapsulamento de princípio ativo de inseticidas químicos e biológicos, este em grande ascensão (Mogul et al., 1996; Carballo 1998; Scher, 1999; Paula et al., 2010). O processo de encapsulamento pode ser utilizado, como revestimento, para substâncias sólidas, líquidas ou gasosas, através do uso de polímeros, podendo-se realizar a liberação de forma controlada e específica do conteúdo das partículas (Suave et al., 2006; Favaro-Trindade et al., 2008).

As partículas formadas no processo de encapsulamento são divididas, de acordo com sua estrutura, em esferas ou cápsulas. As microesferas são um sistema matricial onde a substância ativa, agente de controle, encontra-se

uniformemente dispersa e/ou dissolvida junto ao polímero utilizado no processo. Esta rede polimérica pode ser denominada homogênea ou heterogênea, sendo que no primeiro caso a substância ativa se apresenta no seu estado molecular (dissolvido) e no segundo, na forma de partículas (suspensão), onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Já nas estruturas denominadas cápsulas é possível diferenciar o núcleo, que contém a substância ativa, do invólucro constituído por polímeros de espessuras variáveis. Podem ser denominadas mononucleares ou polinucleares, de acordo com a divisão ou não divisão do núcleo no interior da partícula revestida (Silva et al., 2003).

As propriedades físicas e químicas da substância ativa devem ser levadas em consideração para a seleção do material polimérico a ser utilizado no processo de encapsulamento (Suave et al., 2006). O mesmo deve apresentar algumas características para ser considerado ideal para o uso com a substância ativa em teste, apresentar baixa viscosidade e ser de fácil manipulação durante o processo; possuir baixa higroscopicidade; não reação com o material a ser encapsulado; ter função de selar e segurar o material ativo na estrutura da cápsula; liberar o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação; proporcionar máxima proteção a raios ultravioleta, pH, oxigênio e ingredientes reativos; apresentar solubilidade, além de apresentar propriedades ideais para a liberação do ativo e baixo custo no processo (Santos et al., 2000).

Para a área da fitossanidade, os sais de alginato são os mais indicados para o uso no processo de encapsulamento de produtos, por apresentarem solubilidade em água e não apresentarem toxidez ao microrganismo formulado, nem ao ser humano (Salgado et al., 1993; Sanhueza e Melo, 1995; Batista Filho et al. 1998; Carballo 1998). Entre os sais de alginato mais usados, encontra-se o alginato de sódio (Garcia-Cruz et al., 2008). Este é um polissacarídeo que possui na sua composição resíduos dos ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico na forma de sal de sódio, unidos por ligações glicosídicas (1-4) e distribuídos em diferentes proporções ao longo da cadeia (Smidsrod e Skjak-Braek, 1990; Johnson et al., 1997). As propriedades gelificantes são oriundas da ligação dos cátions divalentes localizados entre os blocos homopoliméricos de resíduos de guluronato ou blocos – G. Já as interações iônicas entre os blocos gluconato e os íons Ca levam à formação de um gel, o qual é termoestável com propriedades

que dependem amplamente das características do polímero e do método de preparação (Fundueanu et al., 1999, Vos et al., 2009).

Dos métodos de encapsulamento, o processo por gelificação iônica é simples e de baixo custo (Mukai-Correa et al., 2005). Neste processo é utilizado principalmente o alginato como componente da membrana e a combinação com íons divalentes, como o cálcio, para induzir a gelificação. O alginato gelifica após ligação dos íons bivalentes de cálcio aos blocos de ácido glucônico das cadeias de alginato constituindo o modelo da “caixa de ovos”. Os íons Ca^{2+} seguem difundindo-se no alginato, fazendo com que o gel vá endurecendo com o tempo (Gombotz e Wee, 1998).

O processo de encapsulamento de agentes de controle microbianos em matrizes poliméricas pode ajudar na estabilidade e viabilidade, proporcionando um microambiente favorável, visto que pode isolá-los da atmosfera e da umidade. Além disso, pode aumentar sua vida útil de prateleira e em campo após aplicação (Vemmer e Patel, 2013). Além da proteção ao agente, o processo de encapsulamento também pode fornecer nutrientes que permitem o crescimento e o desenvolvimento do microrganismo. Outra opção para melhorar as características de um agente de controle microbiano é a coencapsulação de outros microrganismos ou substâncias, tais como inseticidas, semioquímicos ou extratos vegetais, de modo que existam interações sinérgicas em dose reduzida (Wang et al., 2002; Paula et al., 2011; Pant et al., 2012).

Quando encapsulados, os conídios dos fungos entomopatogênicos possuem maior capacidade de sobrevivência em condições de campo (Pereira e Roberts, 1991). Nas formulações de alginato de sódio + fungos, pode-se acrescentar produtos que auxiliam na produção e na eficiência da encapsulação, bem como aumentar a virulência dos fungos encapsulados (Knudsen et al., 1991). Liu e Liu (2009) relataram que conídios de *M. anisopliae* encapsulados com alginato de sódio e o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) apresentaram produção de cápsulas com estruturas homogêneas e com boa eficiência de encapsulação, obtendo-se 78% de liberação dos conídios na solução de PBS.

O encapsulamento de *M. anisopliae* e *B. bassiana* com alginato apresentaram boa viabilidade e virulência contra *Diabrotica undecimpunctata*

howardi Barber (Coleoptera: Chrysomelidae) após exposição à radiação solar artificial (Pereira e Roberts 1991). Segundo Fang et al. (2005), a adição de quitina em formulação pode aumentar a virulência do fungo, pois esta induz a produção de quitinase, importante enzima que age conjuntamente à proteases para hidrolisar a cutícula dos insetos. A adição de quitina (2%) e farelo de trigo (2%) aumentou em três vezes a concentração de conídios no interior das partículas e causou redução na contaminação por *Penicillium* quando o isolado QU-306 de *B. bassiana* foi submetido ao processo de encapsulamento com alginato de sódio (Gerding-González et al., 2007).

Além de fungos entomopatogênicos, também foram testados processos de encapsulamento em fungos fitopatogênicos com alginato, onde resultados promissores na inibição de fungos patogênicos à plantas também foram demonstrados (Moretini e Melo, 2007; Mafia et al., 2003; Maruyama, 2019).

Outro fator que influencia a eficiência de fungos entomopatogênicos em campo é o uso em associação com inseticidas químicos, principalmente quando não se tem o conhecimento prévio de quais efeitos sinérgicos podem ocorrer entre estes produtos e os agentes de controle biológico. Entretanto, devido à grande variabilidade genética e intensa capacidade de multiplicação, as pesquisas evoluem no sentido de descobrir e analisar isolados compatíveis a moléculas químicas presentes no mercado (Guinii e Kimati, 2000). A verificação de compatibilidade de fungos entomopatogênicos e inseticidas no controle de insetos-pragas tem sido desenvolvida e resultados promissores da associação destes dois agentes de controle vêm sendo apresentados (Jaramillo et al., 2005; Shapiro-Ilan et al., 2011; Shakir et al., 2015; Yii et al., 2015; Ashraf et al., 2017; Shewale e Mohite, 2018). A compatibilidade entre fungos entomopatogênicos, em especial *B. bassiana*, e inseticidas para o controle de *S. levis*, bem como o controle de outras espécies de insetos-pragas, é de suma importância para definição de um manejo adequado desta e de outras pragas de solo de ocorrência na cultura da cana-de-açúcar.

2.5. Compatibilidade de inseticidas químicos com fungos entomopatogênicos

Os inseticidas químicos podem influenciar o crescimento, a esporulação e a virulência de fungos entomopatogênicos utilizados no controle de insetos-pragas (Rashid et al. 2010; Hernandez et al. 2012; Tkaczuk et.al. 2012; 2015; Pelizza et al. 2015). Testes de compatibilidade *in vitro* de agrotóxicos com fungos entomopatogênicos descrevem os possíveis efeitos negativos ou positivos que podem ocorrer quando estes aplicados em associação, especialmente em casos em que é realizada a mistura (Rossi-Zalaf et al., 2008). Estes resultados podem ser base para o desenvolvimento de estratégias de MIP, podendo-se associar o uso de fungos entomopatogênicos e inseticidas para o controle de insetos-pragas (Fiedler e Sosnowska, 2017).

Estudos com o intuito de investigar os efeitos de inseticidas sobre fungos entomopatogênicos têm sido realizados desde os primeiros programas de controle com estes patógenos (Hall e Dunn, 1959; Jaques e Patterson, 1962; Ignoffo et al., 1975; Alves e Rigitano; Camargo, 1980), geralmente utilizando-se diversas técnicas, em especial o método de contato entre o fungo e o agrotóxico. Entretanto, a falta de padronização das metodologias dificulta a comparação dos resultados.

A compatibilidade de ingredientes ativos, acetamiprid, imidacloprid e tiametoxam, enquadrados no grupo químico Neonicotinoide, com as principais espécies de fungos entomopatogênicos foi realizado por diversos autores, os quais descrevem resultados promissores em relação a compatibilidade destes ingredientes e das espécies de fungo estudadas. Os mesmos evidenciaram fatores relacionados à baixa toxicidade das moléculas químicas aos microrganismos, e também a possível capacidade dos entomopatógenos em degradarem estes compostos visando seu desenvolvimento e reprodução. Dessa forma, mostraram que a associação pode ser realizada para o controle de insetos (Gassen et al., 2008; Wenzel et al., 2008; Botelho e Monteiro, 2011; Schumacher e Poehling, 2012; Cintra et al., 2013; Castellanos-González et al., 2013; Da Silva et al., 2013; Niassy et al., 2014; Shewale e Mohite, 2018; Pérez-

González e Sánchez-Peña, 2017; Fiedler e Sosnowska, 2017; Da Costa et al., 2018).

Diversas pesquisas com intuito de verificar a compatibilidade de *B. bassiana* e *M. anisopliae* com o ingrediente ativo Azadiractina, caracterizada como um tetranortriterpenoide, consideram esta molécula química compatível com estes microrganismos (Depieri et al., 2005; Santos et al., 2009; Islam et al., 2010; Pires et al., 2010; Islam et al., 2011; Hernández et al., 2012; Ribeiro et al., 2012; Rocha et al., 2012 Duarte et al., 2016; Halder et al., 2017).

O uso de inseticidas organofosforados associados com espécies de fungos entomopatogênicos, evidenciaram muitos casos de compatibilidade entre ambos, mas também muitos relatos relacionados à incompatibilidade. Isso pode caracterizar diferenças entre as metodologias empregadas para a realização dos testes e também das dosagens dos agrotóxicos utilizados (Batista Filho et al., 2001; Tanzini et al., 2002; Gassen et al., 2008; Wenzel et al., 2008; Anhalt et al., 2010; Archana e Ramaswamy, 2012; Niassy et al., 2012; Pinto et al., 2012; Cintra et al., 2013; Santos et al., 2013; Silva et al., 2013; Bernal et al., 2014; Pérez-González e Sánchez-Peña, 2017; Da Costa et al., 2018).

Testes de compatibilidade com fungos entomopatogênicos mostraram que os inseticidas pertencentes aos grupos químicos dos Piretroides foram incompatíveis. Esta incompatibilidade evidencia o elevado grau de toxicidade destas moléculas químicas em relação à sobrevivência destes microrganismos (Batista Filho et al., 2001; Cavalcanti et al., 2002; Tanzini et al., 2002; Oliveira; et al., 2003; SILVA et al., 2006; Archana e Ramaswamy, 2012; Niassy et al., 2012; Oliveira et al., 2016; Pérez-González e Sánchez-Peña, 2017; Meyling et al., 2018).

Pesquisas com o objetivo de verificar o sinergismo de fungos entomopatogênicos e inseticidas no controle de insetos-pragas têm sido desenvolvidas e apresentado resultados promissores da associação destes dois métodos de controle (Jaramillo et al., 2005; Shapiro-Ilan et al., 2011; Shakir et al., 2015; Yii et al., 2015; Ashraf et al., 2017; Shewale e Mohite, 2018).

O controle de insetos-pragas exige inovação humana constante (Hill, 1983), para tanto, o ataque simultâneo ou “ataque duplo” ao alvo, utilizando mais

de um método de controle ou princípio ativo, é um método que se apresenta promissor. Essa abordagem de “ataque duplo” pode resultar em altas taxas de mortalidade ao invés de usar estes métodos de forma independente (Hiromori e Nishigaki, 2001; Bitsadze et al. 2013). Para obter-se resultados satisfatórios de abordagem combinada, a fim de melhorar o controle, requer-se uma melhor compreensão dos mecanismos de compatibilidade entre os inseticidas químicos e os entomopatógenos.

3. REFERÊNCIAS

AGROFIT. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 07 10. 2019.

Alencar MAV (2016) *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae): Caracterização macroscópica e determinação de inseticida e época de aplicação para controle. No. de folhas: tipo 100 f. Tese (Doutorado em) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

Alexander AG (1973) **Sugarcane physiology**. Amsterdam: Elsevier Publishing, 752 p.

Almeida LC (2005) **Bicudo da Cana-de-açúcar**. Piracicaba: Centro De Tecnologia Canavieira, p.1-3. (Boletim Técnico C.T.C).

Almeida L, Stingel E. **Curso de monitoramento e controle de pragas da cana-de-açúcar**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Canavieira, 2005. 32 p.

Alves SB (1998) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ. 1163 p.

Alves SB, Rigitano RL, Camargo JLG (1980). Avaliação da influência de alguns herbicidas utilizados em cana-de-açúcar e pastagens sobre o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, 1883. **Ecossistema**, 5, 21-24.

Angelo IC, Fernandes ÉK, Bahiense TC, Perinotto WM, Moraes APR, Terra AL, Bittencourt VREP (2010). Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary parasitology**, 172: 317-322.

Arruda W, Lübeck I, Schrank A, Vainstein MH (2005). Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. **Experimental & applied acarology**, 37: 231-244.

Ashraf M, Farooq M, Shakeel M, Din N, Hussain S, Saeed N, Rajput, NA (2017). Influence of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, alone and in combination with diatomaceous earth and thiamethoxam on mortality, progeny production, mycosis, and sporulation of the stored grain insect pests. **Environmental Science and Pollution Research**,24: 28165-28174

Badilla FF, Alves SB (1991) Control del picudo de la caña de azúcar *Sphenophorus levis* Vauire (Col.: Curculionidae) con *Beauveria bassiana* y *Beauveria brogniartii* en condiciones de laboratorio y campo. **Revista Interamericana de Ciencias Agrícolas**, 4: 237-243,

Barreto-Triana NDC 2009.**Comportamento sexual e reprodutivo de Sphenophorus levis Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar..** 95p. Tese. (Doutorado em Entomologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo.

Batista Filho A, Alves SB, Alves LFA, Pereira RM, Augusto NT (1998)Formulação de entomopatógenos. In: Alves, S.B. (ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ,. 917-965.

Bernardo CDC. 2016 **Conídios e blastosporos de Metarhizium spp. e Beauveria bassiana: virulência para Rhipicephalus microplus e resposta ao calor e à radiação UV-B**. 97 p. Tese (Medicina Tropical e Saúde) Universidade Federal de Goiás.

Bidochka MJ, Kasperski JE, Wild GAM (1998). Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, 76: 1198–1204,

Bitsadze N, Jaronski S, Khasdan V, Abashidze E, Abashidze, M, Latchininsky A, and Horowitz AR (2013). Joint action of *Beauveria bassiana* and the insect growth regulators diflubenzuron and novaluron, on the migratory locust, *Locusta migratoria*. **Journal of Pest Science**, 86, 293-300.

Bittencourt VREP, Mascarenhas AG, Faccini JLH, (1999) Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural**, v. 29, 351–354,

Borges Filho R, Sturza VS, Bernardi D, Da Cunha US, Pinto AS, Silva SDDA, Nava DE (2019). Population dynamics of pests and natural enemies on sugar cane grown in a subtropical region of Brazil. **Florida Entomologist**, 102, 526-530

Braga GU, Rangel DE, Fernandes ÉK, Flint SD, Roberts DW (2015). Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. **Current genetics**, 61: 405-425.

Braga GUL, Flint SD, Messias CL, Anderson AJ, Roberts DW (2001a) Effects of UV-B irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic Hyphomycete *Metarhizium anisopliae*; a study of reciprocity and recovery. **Photochemistry and Photobiology**. 73: 140-146.

Braga GUL, Flint SD, Miller CD, Anderson AJ, Roberts DW (2001b) Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61° N to 54° S. **Journal of Invertebrate Pathology**. 78: 98-108.

Braga GUL, Rangel DEN, Flint SD, Miller CD, Anderson AJ, Roberts DW (2002). Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. **Mycologia**, 94: 912-920.

Braga GUL, Flint SD, Miller CD, Anderson AJ, & Roberts DW (2001c). A radiação solar UVA e a UVB prejudicam a cultura conidial e retardam a germinação no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. **Fotoquímica e Fotobiologia**. 74: 734-739.

Butler M, Day AW. (1998). Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, 1136:1115–1136.

Cagan L, Svercel M. (2001). The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* HBN. (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Central European Agriculture**, Konosu Saitama, 2: 119-125.

Canali MC (2017). **Prospecção de fungos entomopatogênicos para o controle biológico de formigas cortadeiras**. 117 f. Dissertação (Ciências Biológicas: Área de Microbiologia Aplicada) Universidade Estadual Paulista.

Carballo M (1998) Formulación de hongos entomopatógenos. **Revista Manejo Integrado de Plagas**, 47:1-4

Castellanos González L, Nicaio L, María E, Muiño BL (2013). Compatibilidad de cuatro plaguicidas de diferentes grupos químicos con *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & Gams. **Revista de Protección Vegetal** 28: 199-203.

Chelico L, Khachatourians GG (2008). Isolation and characterization of nucleotide excision repair deficient mutants of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 98: 93-100,

Cícero EAS, Ferraudo AS, Lemos MVF. Identificação de genes cry de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Sphenophorus levis*, o bicudo da cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 68, n. 4, p. 817-823, 2009.

Da Costa MA, Loureiro EDS, Pessoa LGA, Dias PM (2018). Compatibilidade de inseticidas utilizados na cultura do eucalipto com *Metarhizium rileyi* (Farlow) (= *Nomuraea rileyi*). **Journal Of Neotropical Agriculture**, 5, 44-48.

Degaspari N, Botelho PSM, Almeida LC, Castilho HJ (1987) Biologia de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Col.: Curculionidae), em dieta artificial e no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 22: 553-558.

Delfanti LAA (2012). **Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* no controle de *Sphenophorus levis* e efeito em outras pragas de solo em cana-de-açúcar**. 30f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Agronomia) – Centro Universitário Moura Lacerda, Ribeirão Preto.

Dinardo-Miranda LL, Fracasso JV (2010). Effect of insecticides applied at sugarcane planting on *Sphenophorus levis* Vaurie (Coleoptera; Curculionidae) control and on the yield of first two harvests. **Proceedings International Society of Sugar Cane Technology**, 27: 1-5

Dinardo-Miranda LL (2000). **Ocorrência de *Sphenophorus levis* em 2000. Stab – Açúcar, Alcool e Subprodutos**. 19: 26.

Dinardo-Miranda LL (2008). Pragas. In: Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos ACM, Landell MGA. **Cana de açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 349 - 404.

Dinardo-Miranda LL (2014) *Sphenophorus levis*. In: Dinardo-Miranda. LL **Nematoides e pragas da cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico. 7: 210-262.

Dinardo-Miranda LL, Fracasso JV (2013). Sugarcane straw and the populations of pests and nematoids. **Scientia Agricola** 70, 305-310.

Dos Santos MD, Duarte ME, Valente ECN, Barbosa TJA, Silva ES (2016). Eficiência de isolados comerciais de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok (Hypocreales: Cordycipitaceae, Clavicipitaceae) sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Revista Brasileira de Biociências**, 14.

Duarte RT, Gonçalves KC, Espinosa DJL, Moreira LF, De Bortoli SA, Humber RA, Polanczyk RA (2016). Potential of entomopathogenic fungi as biological control agents of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) and compatibility with chemical insecticides. **Journal of Economic Entomology** 109: 594-601.

Fan Y, Kruer SN, Keyhani NO (2011) High-throughput insertion mutagenesis and functional screening in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 106, 274-279.

Fang W, Leng B, Xiao Y, Jin K, Ma J, Fan Y, Feng J, Yang X, Zhang Y, Pei Y (2005). Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, 71: 363-370.

Fargues J, Goettel MS, Smits N, Ouedraogo A, Vidal C, Lacey LA, Lomer CJ, Rougier M (1996). Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic hyphomycetes. **Mycopathologia** 135: 171-181.

Favaro-Trindade CS, Pinho SC, Rocha GA (2008). Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of food Technology**, 11: 103-112

Fernandes EKK, Bittencourt VREP (2008). Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental & applied acarology** 46: 71–93.

Fernandes EK, Rangel DE, Moraes AM, Bittencourt VR, Roberts DW (2007). Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. **Journal of invertebrate pathology**, 96: 237-243.

Fiedler Ž, Sosnowska D (2017). Side effects of fungicides and insecticides on entomopathogenic fungi in vitro. **Journal of Plant Protection Research** 57: 4.

FNP Consultoria & Comércio (2015). Cana-de-açúcar. In: Agrianual 2015: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 201-230.

Fourtouni A, Manetas Y, Christias C (1998). Effects of UV-B radiation on growth, pigmentation, and spore production in the phytopathogenic fungus *Alternaria solani*. **Canadian Journal of Microbiology** 76, 2093-2099.

Friedberg EC, Walker GC, Siede W (1995). **DNA Repair and Mutagenesis**.

Fundueanu G, Nastruzzi C, Carpov A, Desbrieres J, Rinaudo M. (1999) Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. **Biomaterials**, 20: 1427-1435.

Gerding-González M, France A, Sepulveda ME, Campos J (2007). Use of chitin to improve a *Beauveria bassiana* alginate-pellet formulation. **Biocontrol Science and Technology**, 17: 105-110.

Giometti FHC. **Avaliação De nematoides entomopatogenicos para o controle de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae)**. 2009. 41 f. (Dissertação, Mestrado em Sanidades vegetal, Segurança alimentar e o ambiente.) - Instituto Biológico, São Paulo, 2009.

Giometti FHC, Leite LG, Tavares FM, Schmit FS, Batista Filho A, Dellaacqua R (2011). Virulência de nematóides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) a *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae). **Bragantia**, 70: 81-86.

Girón-Pérez K, Nakano O, Silva AC Oda-Souza M (2009). Atração de adultos de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) a fragmentos vegetais em diferentes estados de conservação. **Neotropical Entomology**. 38: 1-6.

Goettel MS, Inglis GD (1997). Fungi: Hyphomycetes. **Manual of the techniques in insect pathology**. p.409.

Gombotz WR, Wee SF (2012). Protein release from alginate matrices. **Advanced drug delivery reviews**, 64, 194-205.

Halder J, Kushwaha D, Rai AB, Singh A, Singh B (2017). Potential of entomopathogens and neem oil against two emerging insect pests of vegetables. **Indian Journal of Agricultural Sciences** 87: 220-224.

Hall IM, Dunn PH (1959). The effect of certain insecticides and fungicides on fungi pathogenic to the spotted alfalfa aphid. **Journal of Economic Entomology**, 52: 28-29.

Hartelt K, Wurst E, Collatz J, Zimmermann G, Kleespies RG, Oehme RM, Mackenstedt U. (2008). Biological control of the tick *Ixodes ricinus* with entomopathogenic fungi and nematodes: Preliminary results from laboratory experiments. **International Journal of Medical Microbiology**, 298: 314-320.

Hernandez MM, Martinez-Villar E, Peace C, Perez-Moreno I, Marco V (2012). Compatibility of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* with flufenoxuron and azadirachtin against *Tetranychus urticae*. **Experimental and Applied Acarology** 58: 395–405.

Hideg E, Jansen MAK, Strid A (2013). UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? **Trends in plant science**, 18:107–115.

Hill DS (1983). Agricultural insect pests of the tropics and their control. **Cambridge University Press**.

Hiromori H, Nishigaki J (2001). Factor analysis of synergistic effect between the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and synthetic insecticides. **Applied Entomology and Zoology**, 36: 231-236.

Hunt TR, Morre D, Higgins PM, Prior C (1994). Effect of sunscreens, irradiance and resting periods on the germination of *Metarhizium flavoviride*. **Entomophaga** 39: 312-322.

Ignoffo CM, Hostetter DL, Garcia C, Pinnell RE (1975). Sensitivity of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* to chemical pesticides used on soybeans. **Environmental Entomology**, 4: 765-768.

Inglis GD, Goettel MS, Butt TM, Strasser H (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**, 23-69

Inglis GD, Goettel M, Johnson DL (1995). Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Biological Control**, 5: 581-590.

Inglis GD, Johnson DL, Goettel M (1997). Effects of temperature and sunlight on mycosis (*Beauveria bassiana*) (Hyphomycetes: Symptodulosporae) of grasshoppers under field conditions. **Biological Control**. 26: 400-409.

Jaques RP, Patterson NA (1962). Control of the apple sucker, *Psylla mali* Schmidb., by the fungus *Entomophthora sphaerosperma* (Fresenius). **The Canadian Entomologist**, 94: 818-825.

Jaramillo J, Borgemeister C, Ebssa L, Gaigl A, Tobón R, Zimmermann G (2005). Effect of combined applications of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain CIAT 224 and different dosages of imidacloprid on the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae). **Biological Control**, 34: 12-20.

Johnson Fiona A, Craig Duncan QM, Mercer AD (1997). Characterization of the block structure and molecular weight of sodium alginates. **Journal of pharmacy and pharmacology**49: 639-643.

Klein LAS (2017). **Secretoma de *Beauveria bassiana* relacionado à infecção no carrapato bovino *Rhipicephalus microplus***.52 f. Dissertação (Biotecnologia). Centro Universitário UNIVATES.

Knudsen GR, Eschen DJ, Dandurand LM, Wang ZG (1991). Method to enhance growth and sporulation of pelletized biocontrol fungi. **Applied and Environmental Microbiology** 57: 2864-2867.

Kogan M. (1998). Integrated pest management: Historical perspective and contemporary developments. **Annual Review Entomology**, 43: 43-70.

Leach CM (1965). Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi. **Canadian Journal of Botany**. 43: 185-200, 1965.

Leite LG, Tavares FM, Botelho PSM, Batista Filho A, Polanczyk RA, Schmidt FS. (2012). Eficiência de nematoides entomopatogênicos e inseticidas químicos contra *Sphenophorus levis* e *Leucothyreus* sp. em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 42: 40-48.

Leite LG, Batista Filho A, Tavares FM, Ginarte CMA, Botelho PSM, Almeida LC (2006). Alternativa de controle. **Revista Cultivar**, p. 30 – 33.

Leite LG, Batista AF, Ginarte AMA, Tavares FM, Almeida LC, Botelho PSM (2005). Alternativa de controle: bicudo da cana-de-açúcar. IN: **Revista Cultivar Grandes Culturas**, n. 83.

Liu CP, Liu SD (2009). Low-temperature spray drying for the microencapsulation of the fungus *Beauveria bassiana*. **Drying Technology**, 27:747-753.

Lopes DOP, Dinardo-Miranda LL, Busoli AC (2011). Atualidades em pragas da cultura da cana-de-açúcar: sudeste e nordeste do Brasil. In: BUSOLI, AC, Fraga DF, Santos LC, Alencar JRDCC, Grigolli JFJ, Janini JC, Souza LA Viana MA, Funichello M **Tópicos em Entomologia Agrícola**. Jaboticabal: Multipress, 47-64.

Mafia RG, Alfenas AC, Maffia LA, Ventura GM, Sanfuentes EA (2003). Encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* na propagação clonal de *Eucalyptus*. **Fitopatologia brasileira**, 28:101-105.

Maruyama CR (2019). **Micropartículas poliméricas como sistema carreador do fungo Trichoderma harzianum visando aplicações na agricultura**. 129 f. Tese (Ciências Ambientais) Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Meyling NV, Eilenberg J (2006). Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. **Agriculture, Ecosystems & Environment**.113: 336–341.

Meyling NV, Eilenberg J (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. **Biological Control**. 43: 145-155.

Mogul MG, Akin H, Hasirci N, Trantolo DJ, Gresser JD Wise DL (1996). Liberação controlada de agentes biologicamente ativos para fins de gerenciamento de culturas agrícolas. **Recursos, conservação e reciclagem** 16: 289-320.

Moraes GC, Ávila CJ (2013). *Sphenophorus levis* detected in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Agricultural Science Research Journals**, 3:36-37.

Moraes MAFD, Oliveira FCR e Diaz-Chavez, RA (2015). Impactos socioeconômicos da indústria brasileira de cana-de-açúcar. **Desenvolvimento Ambiental**, 16, 31–43.

Moretini A, Melo IS, (2007) Formulação do fungo *Coniothyrium minitans* para controle do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 42: 155–161.

Mukai-Correa R, Prata AS, Alvim ID, Grosso C. (2005). Caracterização de microcápsulas contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada obtidas por gelificação iônica. **Brazilian Journal of Food Technology**. 8: 73-80.

Oliveira RCD, Alves LFA, Neves PMOJ (2002). Susceptibility of *Oligonychus yothersi* (Acari: Tetranychidae) to the fungus *Beauveria bassiana*. **Scientia Agrícola**, 59: 187-189.

Pagliarani, VD (2012) **Formulação e dose do fungo *Beauveria bassiana* no controle de *Sphenophorus levis* e efeito em pragas de solo em cana-de-açúcar**. 23f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Agronomia) – Centro Universitário Moura Lacerda, Ribeirão Preto.

Pant M, Dubey S, Raza SK, Patanjali PK (2012). Encapsulation of neem and karanja oil mixture for synergistic as well as larvicidal activity for mosquito control. **Journal of Scientific and Industrial Research**, 71: 348-352.

Paula AR, Carolino A T, Paula CO, Samuels RI (2011). The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasites & vectors**, 4: 8.

Paula HC, De Oliveira EF, Abreu FO, De Paula RC, De Moraes SM, Forte MM. (2010). Esferas (beads) de alginato como agente encapsulante de óleo de croton zehntneri pax et hoffm. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 20: 112-120.

Pavlu FA (2012). **Plano de amostragem e distribuição espacial visando o controle localizado de *Sphenophorus levis* na cultura da cana-de-açúcar**. 2012. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba,

Pedroso JCM (2014). **Predador versus entomopatógeno: *Podisus distinctus* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae) desafiado por *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae***. 72 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Pelizza SA, Scorsetti AC, Fogel MN, Pacheco-Marino SG, Stenglein SA, Cabello MN, Lange CE (2015). Compatibility between entomopathogenic fungi and biorational insecticides in toxicity against *Ronderosia bergi* under laboratory conditions. **Bio Control** 60: 81–91.

Pereira RM, Roberts DW (1991). Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Economic Entomology**, 84: 1657-1661.

Pinto APF, Batista Filho A, De Almeida JEM, Wenzel IM (2013). Patogenicidade de *Beauveria bassiana* ao psílídeo *Diaphorina citri* e compatibilidade do fungo com produtos fitossanitários. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 47:1673-1680.

Pinto AS, Botelho PSM, De Oliveira HN (2009). **Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos da cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP2. 108 p.

Pinto AS (2006). O controle biológico de pragas da cana-de-açúcar. In **Controle de pragas da cana-de-açúcar**. Boletim Técnico Biocontrol, In: PINTO AS Ed. **Biocontrol**. Sertãozinho, 1: 09-13.

Polanczyk RA, Almeida LC, Padulla L, Batista Alves S. (2004). Pragas de cana-de-açúcar x métodos alternativos de controle. **Revista de biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 33: 14-17.

Precetti AACM, Arrigoni EB (1990). **Aspectos biológicos e controle do besouro *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar**. Boletim Técnico Coopersucar – Edição Especial. 15p.

Prestes TMV, Pietrowski V, Zanini A, Formentini MA, Alves LFA (2015). Natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Moniliales: Moniliaceae) and pathogenicity on *Protortonia navesi* Fonseca (Hemiptera: Monophlebidae) in cassava plantation, in Marechal Cândido Rondon, Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, 821-4.

Rangel DE, Anderson AJ, Roberts DW (2008). Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycological research**, 1121362-1372.

Rangel DE, Braga GU, Anderson AJ, Roberts DW. (2005). Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. **Journal of invertebrate pathology** 90: 55-58.

Rangel DEN, Bytler MJ, Torabinejad J, Anderson AJ, Braga GUL, Day AW, Roberts DW (2006). Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. **Journal of Invertebrate Pathology** 93: 170- 182.

Rashid M, Baghdadi A, Sheikhi A, Pourian HR, Gazavi M (2010) Compatibility of *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) with several insecticides. **Journal of Plant Protection Research** 50: 22–27.

Ribeiro MM (2013). **Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., em *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae), em condições de laboratório e de campo**. 69 f. Dissertação (Engenharia Florestal, área de concentração em Silvicultura) Universidade Federal do Paraná.

Richter K, Haslbeck M, Buchner J (2010). The heat shock response: life on the verge of death. **Molecular cell**, 40253–66.

Rossi-Zalaf LS, Alves SB, Lopes RB, Neto SS, Tanzini MR (2008). Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças, p.279-302. In Alves SB, Lopes RB (ed.) **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba, FEALQ, 414p.

Salgado SML, Campos VP (1993) Formulação do fungo *Arthrobotrys canoides* em alginato de sódio para o controle de nematóides. **Nematologia Brasileira** 17:140-151.

Salvador Neto, N (2012). **Doses dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* GR no controle de *Sphenophorus levis* e corós em cana-de-açúcar.** 25f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Agronomia) – Centro Universitário Moura Lacerda, Ribeirão Preto.

Sanhueza RMV Melo, IS (1995). Encapsulamento de microrganismos. **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos.** Jaguariúna: Embrapa-CNPMA 1: 60-63.

Santiago AD, Rossetto R (2008). Arvore do conhecimento: cana-de-açúcar. **Brasília: AGEITEC–Agência Embrapa de Informação Tecnológica**

Santos ÁBS, Da Silva TFB, Paiva LM, Santos AC, Alves-Lima EADL (2009). Efeito fungitóxico do óleo de nim sobre *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Revista Caatinga** 22: 17-22.

Santos AB, Ferreira VP, Grosso CRF (2000). Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleoresina de páprica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 3: 26-30

Scarpari MS, Beauclair EGF (2008) Anatomia e Botânica. In: Dinardo-Miranda LL Vasconcelos ACM, Landell MGA. **Cana de açúcar.** Campinas: Instituto Agrônomo, 47 – 56,

Scher HB. **Controlled-release delivery systems for pesticides.** CRC Press, 1999.

Setlo B, Setlow P (1996). Role of DNA Repair in *Bacillus subtilis* Spore Resistance. **Journal of Bacteriology**, 178: 3486–3495.

Shakir HU, Saeed M, Anjum N, Farid A, Khan IA, Liaquat M, Badshah T. (2015). Combined effect of entomopathogenic fungus (*Beauveria bassiana*), imidacloprid and potassium silicate against *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae) in rice crop. **Journal of Entomology and Zoology Studies** 3: 173-77.

Shang Y, Duan Z, Huang W, Gao Q, Wang C (2012). Improving UV resistance and virulence of *Beauveria bassiana* by genetic engineering with an exogenous tyrosinase gene. **Journal of invertebrate pathology**, 109: 105-109,

Shapiro-Ilan DI, Cottrell TE, Wood BW (2011). Effects of Combining Microbial and Chemical Insecticides on Mortality of the Pecan Weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, 104: 14-20.

Shewale CP, Mohite PB (2018). Combined Efficacy of Entomopathogenes and Insecticides Against White Grub, *Leucopholis lepidophora* (Blanchard) Infesting Sugarcane. **Journal of Entomology and Zoology Studies** 6: 1824-1827.

Silva C, Ribeiro A, Ferreira D, Veiga F. (2003). Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de ciências farmacêuticas**, 39: 1-20,

Silva RP (2014). **Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL sobre cupins urbanos**. Trabalho de conclusão de curso. (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba.

Simi LD (2014). **Controle de *Sphenophorus levis* e *Conotrachelus humeropictus* pelo uso combinado de nematoides e fungos entomopatogênicos**. 107 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Smidsrod O, Skja G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in biotechnology**, 8: 71-78.

Sosa-Gomez DR, Boucias DG, Nation JL (1997). Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. **Journal of Invertebrate Pathology**, 69: 31–39.

Suave J, Dall'agnol EC, Pezzin APT, Silva DAK, Meier MM, Soldi V (2006). Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente/Health and Environment Journal**, 7: 12-20.

Svedese VM, Silva APDAP, Lopes RDS, Santos JFD, Lima E (2012). Action of entomopathogenic fungi on the larvae and adults of the fig fly *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). **Ciência Rural**, 42: 1916-1922.

Tamai MA, Alves SB, Neves PJ (1999). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against *Tetranychus urticae* Koch. **Scientia Agricola**, 56: 285-288.

Tavares FM, Batista Filho A, Leite LG, Almeida LC, Silva AC, Ambrós CM (2017). Efeito de *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Nemata: Rhabditida) sobre larvas do bicudo da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), em laboratório e casa-de-vegetação. **Nematologia Brasileira**, 31: 12-19.

Taylor P, Grand ML, Cliquet S (2013). Impact of culture age on conidial germination, desiccation and UV tolerance of entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, 23: 847–859.

Terán F, Precetti AACM (1982). *Sphenophorus levis* e *Metamasius hemipterus* como pragas da cana-de-açúcar. **Boletim Técnico Copersucar**. 18: 24-26.

Tkaczuk C, Harasimiuk M, Król A, Bereś PK (2015) The effect of selected pesticides on the growth of entomopathogenic fungi *Hirsutella nodulosa* and *Beauveria bassiana*. **Journal of Ecological Engineering** 16: 177–183.

Tkaczuk C, Krzyczkowski T, Głuszcak B, Król A (2012). Wpływ wybranych środków ochrony roślin na wzrost kolonii i kiełkowanie zarodników owadobójczego grzyba *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. [The influence of selected pesticides on the colony growth and conidial germination of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill]. **Progress in Plant Protection** 52: 969–974.

Valle TL (1984). **Influência da qualidade da luz no crescimento e esporulação do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. 1984. 78 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Vanin SA (1990). A new species of *Sphenophorus* Schoenherr from Brazil (Coleoptera, Curculionidae, Rhynchophorinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, 34: 697-701.

Vaurie P (1978). Revision of the genus *Sphenophorus* in South America. **American Museum Novitates**, 26: 1-30.

Vega FE, Goettel MS, et al., (2009). Fungal Entomopathogens: New Insights on Their Ecology". **Fungal Ecology**. 2: 149-159.

Vemmer M, Patel AV (2013). Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. **Biological Control**, 67: 380-389.

Vos P, Buck, M, Gemeiner P, Navrátil M. (2009). Multiscale requirements for bioencapsulation in medicine and biotechnology. **Biomaterials**, 30: 2559-2570.

Wang CS, Li ZZ, Butt TM (2002). Molecular studies of co-formulated strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Journal of invertebrate Pathology**, 80: 29-34.

Watson DW, Geden CJ, Long SJ, Rutz DA (1995). Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). **Biological control**, 5: 405-411

Xie XQ, Li F, Ying SH, Feng MG. (2012). Additive contributions of two manganese-cored superoxide dismutases (MnSODs) to antioxidation, UV tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*. **Plos one**, 7: 1–12.

Yii JE, Bong CFJ, King JHP, Kadir J. (2015). Synergism of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* incorporated with fipronil against oil palm pest subterranean termite, *Coptotermes curvignathus*. **Plant Protection Science**, 52: 35-44.

Zambiazzi EV, Guilherme SR, Corassa JDN, Bonaldo, SM, Zuffo AM, Soares I. O, Oliveira DDCDS (2016). Patogenicidade de *Beauveria bassiana* no controle in vitro da lagarta-da-espiga do milho (*Helicoverpa zea*). **Revista de Ciências Agrárias**, 39: 89-94.

Zarbin PH, Arrigoni EDB, Reckziegel A, Moreira JA, Baraldi PT, Vieira, PC (2003). Identification of male-specific chiral compound from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **Journal of chemical ecology**, 29: 377-386.

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

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RADIAÇÃO UV EM *Beauveria bassiana* ENCAPSULADA E PATOGENICIDADE A *Sphenophorus levis*

RESUMO - *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae) é uma espécie de fungos entomopatogênicos com grande potencial para ser utilizada no controle de pragas em diversas culturas agrícolas. Porém este entomopatógeno pode ter sua eficiência influenciada por fatores abióticos, como a radiação ultravioleta. O uso da técnica de encapsulamento pode auxiliar na redução destes efeitos sobre os conídios do fungo. O presente estudo teve como objetivo verificar se o processo de encapsulação de *B. bassiana* reduz os efeitos da radiação UV ao desenvolvimento do fungo e na patogenicidade a *Sphenophorus levis* Vaurie (Coleoptera: Curculionidae). O isolado utilizado foi o IBCB170, o qual causa maior taxa de mortalidade ao inseto. Os insetos foram coletados em campo e a criação foi estabelecida em laboratório. O encapsulamento do fungo foi realizado pelo método de gelificação iônica, com uma suspensão de alginato de sódio contendo o fungo em uma solução de cloreto de cálcio. O teste de patogenicidade foi realizado com partículas secas e úmidas, sendo divididas em duas quantidades 0,05 e 0,1 g. Fungos não encapsulados também foram utilizados para o teste. Para avaliação dos efeitos da radiação UV os fungos encapsulados e não encapsulados foram expostos à radiação UV-A e UV-B em diferentes tempos (0, 30, 60, 120, 240, 480 e 720 minutos) e, após 7 dias, as colônias de crescimento foram mensuradas. O fungo não encapsulado causou mortalidade de 100% dos insetos, já o fungo encapsulado causou uma mortalidade observada de 60% para partículas úmidas nas duas quantidades usadas, sendo que em 75% dos insetos mortos houve esporulação do fungo. Quando foram usadas partículas secas, a mortalidade foi de 30% para 0,05 g, com 25% dos insetos mortos apresentando esporulação do fungo, e 40% de mortalidade com a quantidade de 0,01 g de partículas, com 83,3% dos insetos mortos apresentando esporulação do fungo. Quanto a radiação UV nos tempos de exposição de 30 e 480 minutos o tamanho da colônia do fungo não encapsulado diferiu significativamente do fungo encapsulado. O fungo encapsulado causou menor taxa de mortalidade de *S. levis* em relação ao fungo não encapsulado. A realização de estudos com outros materiais de encapsulamento e maiores concentrações do fungo deverão ser realizadas para aperfeiçoamento desta técnica de encapsulamento para *B. bassiana*.

Palavras-chave: Encapsulamento, UV-A e UV-B, mortalidade, fungos entomopatogênicos

CHAPTER 2 – EVALUATION OF THE EFFECTS OF UV RADIATION ON ENCAPSULATED *Beauveria bassiana* AND PATHOGENICITY TO *Sphenophorus levis*

ABSTRACT - *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae) is a species of entomopathogenic fungi with great potential for pest control in several crops. However, this entomopathogen may have its efficiency influenced by abiotic factors such as ultraviolet radiation. The use of encapsulation techniques can help to reduce these effects on fungus conidia. The present study aimed to verify whether the encapsulation process of *B. bassiana* influences the effects of UV radiation on fungal development and pathogenicity to *Sphenophorus levis* Vaurie (Coleoptera: Curculionidae). The isolate used was IBCB170, which causes a higher mortality rate to this insect. The insects were collected in the field and the rearing was established in the laboratory. The encapsulation of the fungus was performed by ionic gelation, with a suspension of sodium alginate containing the fungus in a calcium chloride solution. The pathogenicity test was performed with dry and wet particles, being divided into two quantities 0.05 and 0.1 g. The unencapsulated fungi were also used for the test. To evaluate the effects of UV radiation encapsulated and unencapsulated fungi were exposed to UV-A and UV-B radiation at different times (0, 30, 60, 120, 240, 480 and 720 minutes) and, after 7 days, growth colonies were measured. The unencapsulated fungus caused 100% mortality of insects, while the encapsulated fungus caused observed mortality of 60% for wet particles in both quantities used, and 75% of dead insects had sporulation of the fungus. When using dry particles, mortality was 30% to 0.05 g, with 25% of dead insects showing sporulation of the fungus, and 40% mortality with 0.01 g of particles, with 83.3% of dead insects showing sporulation of the fungus. As for UV radiation at exposure times 30 and 480 minutes the colony size of the unencapsulated fungus differed significantly from the encapsulated fungus. The encapsulated fungus caused a lower mortality rate of *S. levis* in relation to the unencapsulated fungus. Studies with other encapsulation materials and higher fungal concentrations should be performed to improve this *B. bassiana* encapsulation technique.

Keywords: Encapsulation, UV-A and UV-B, mortality, entomopathogenic fungi

1. INTRODUÇÃO

Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae) se destaca entre as espécies de fungos entomopatogênicos mais promissoras para o controle de pragas em diversas culturas agrícolas, por apresentar epizootia à diversas espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Isoptera e Diptera (Svedese et al., 2012; Pinto et al., 2013; Ribeiro, 2013; Silva, 2014; Prestes et al., 2015; Zambiazzi et al., 2016; Canali, 2017), bem como a ácaros e carrapatos bovinos (Tamai et al., 1999; Oliveira et al., 2002 Dos Santos et al., 2015; Bernardo, 2016; Klein, 2017). Frequentemente, a epizootia ocorre de forma natural, uma vez que estes entomopatógenos podem ser encontrados em amostras de solo, e têm como uma das principais características realizarem a infecção de seus hospedeiros por contato (Vega et al., 2009).

Os fungos entomopatogênicos, especialmente *B. bassiana*, apresentam um grande potencial de uso no Manejo Integrado de Pragas (MIP), uma vez que podem ser utilizados de maneira *in natura*, produzido em larga escala e aplicados sem o desenvolvimento de formulações comerciais (Rangel et al., 2008). O uso deste inimigo natural para o controle de insetos-pragas tem como principais vantagens a especificidade e seletividade, a baixa probabilidade de os insetos-alvo a pressão de seleção, a baixa toxicidade ao meio ambiente e ao aplicador, assim como o menor custo de desenvolvimento e registro em relação às moléculas químicas (Alves,1998). No entanto, este entomopatógeno sofre grande influência de fatores abióticos que podem afetar sua sobrevivência, viabilidade de conídios, desenvolvimento a nível de campo e infecção do hospedeiro (Rangel et al 2008; Fernandes e Bittencourt, 2008; Polar et al., 2015).

A radiação ultravioleta (UV) é um dos fatores abióticos de maior importância para o desenvolvimento de fungos, por causar aquecimento e dessecação de conídio além de danos irreversíveis ao DNA, proteínas, biomembranas, RNA, ribossomos e mutações que influenciam diretamente na germinação, inativando os conídios e, consequentemente, reduzindo a atividade inseticida (Rangel et al., 2006; Chelico e Khachatourians, 2008; Hideg et al., 2013; Braga et al., 2015). Dentre os tipos de radiação UV, a UV-A e UV-B,

quando absorvida diretamente pelo DNA, causa a formação de dímeros de pirimidina e mutagênese. Por outro lado, a radiação UV-A causa danos oxidativos e danos indiretos ao DNA por foto sensibilização e formação de formas reativas de oxigênio (Friedberg et al., 1995).

A temperatura com a radiação UV apresenta-se como grande influenciador no insucesso e falhas dos programas de controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos (Rangel et al., 2005). Portanto, o desenvolvimento de estudos visando reduzir estes danos são de suma importância para o sucesso no uso destes agentes de biocontrole. A identificação de isolados com maior tolerância às condições adversas presentes no ambiente e o uso de novas técnicas de formulação destes agentes podem ser um caminho para o aumento da persistência e redução da perda de eficiência em campo (Fariae e Wraight, 2007; Michereff Filho et al., 2009).

O uso de técnicas de encapsulamento se apresenta como um grande aliado em formulações de bioinseticidas, uma vez que permite envolver a ação de um ingrediente ativo ou agente de controle, com o auxílio de materiais que auxiliam na proteção contra a radiação UV, altas temperaturas e baixa umidade relativa, além da possibilidade de desenvolver sistemas de liberação controlada do agente de controle (Vemmer e Patel, 2013). As técnicas de encapsulamento geram microcápsulas que contêm inúmeros conídios de fungo em seu interior, encapsulados em materiais como gelatina, amido, celulose, alginato de sódio, etc. Estas microcápsulas, após processo de secagem, podem ser armazenadas por longos períodos e serem aplicadas diretamente no solo ou no inseto alvo, não havendo a necessidade de dispersão em meio aquoso (Burges, 1998). Estas microcápsulas podem conter em seu interior fungos entomopatogênicos que apresentam ampla gama de hospedeiros e podem ser utilizadas no MIP em diversas culturas. Em cana-de-açúcar, o uso de fungos para o controle de diversas espécies de insetos-pragas é conhecido. Esta cultura tem grande importância socioeconômica para o Brasil, uma vez que, além de outros produtos, é a principal matéria prima para a produção de açúcar e etanol (Lopes et al, 2011).

Dentre as espécies de insetos-praga que causam perdas econômicas na cultura da cana-de-açúcar, os insetos de solo são os que apresentam maior dificuldade de controle, por estarem protegidos na camada de palha e no solo. Em função deste hábito, a visualização da praga em muitos casos não é possível ou é muito rara, só podendo ser detectada sua presença quando os danos são causados às plantas e os sintomas se tornam visíveis (Dinardo-Miranda, 2008). *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) é considerado o principal inseto-praga de solo na cana-de-açúcar, podendo causar perdas anuais de 20 a 30 toneladas e provocar a morte de 50 a 60% dos perfilhos ainda na fase de cana-planta (Terán e Precetti, 1982; Precetti e Arigoni, 1990; Polanczyk et al., 2004; Girón-Pérez et al., 2009). A utilização de *B. bassiana* no controle *S. levis* tem demonstrado resultados promissores (Badilla e Alves, 1991; Pagliarani, 2012; Salvador Neto, 2012; Simi 2014). Tendo em vista essa problemática, O presente estudo teve como objetivo verificar se o processo de encapsulação de *B. bassiana* influencia nos efeitos da radiação UV ao desenvolvimento do fungo e na patogenicidade a *S. levis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga (LCMAP) e no Laboratório de Biologia de Insetos (LBCI) do Departamento de Fitossanidade, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), Campus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. O processo de encapsulamento foi realizado no Laboratório de Nanotecnologia Ambiental, no Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Sorocaba, São Paulo, Brasil.

2.1 - Obtenção e criação de *Sphenophorus levis* e do isolado de *Beauveria bassiana*

A criação de *S. levis* foi conduzida e mantida no LCMAP. Para iniciar a criação do inseto foram realizadas coletas de adultos em lavouras de cana-de-

açúcar na região do município de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. As coletas foram realizadas com iscas produzidas com toletes de cana-de-açúcar (~30 cm de comprimento). Os toletes foram cortados ao meio, colocados próximos as touceiras e cobertos com palha. Após um período de 24 horas as iscas foram revisadas, os insetos retirados e as mesmas foram reutilizadas durante 7 dias. Os insetos coletados foram acondicionados em caixas plásticas (11 L) com um tolete de cana-de-açúcar (semelhante aos das iscas) e levados ao laboratório. Estas caixas continham pequenos furos na tampa para que houvesse a troca de ar.

Em laboratório, os insetos foram colocados sob água corrente para retirada de impurezas oriundas do campo. Posteriormente, foram acondicionados em caixa plásticas (5 L) contendo um tolete de cana-de-açúcar rachado ao meio, o qual foi utilizado como alimentação e substrato de oviposição. A troca dos toletes foi realizada, assim como a retirada dos ovos, 3 vezes por semana. A retirada dos ovos foi realizada com o auxílio de uma faca, para retirada de lascas finas do tolete a fim de se expor os ovos. Estes, foram coletados com pincel fino (no. 2) e acondicionados em placas de Petri (6 cm de diâmetro) contendo papel filtro umedecido com sulfato de cobre (1%). As placas contendo os ovos foram acomodadas em câmara do tipo B.O.D. com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12:12 h. Após a eclosão, as larvas foram transferidas para um tubo de ensaio (9 cm de comprimento) contendo uma dieta artificial descrita inicialmente por Singh (1978) e modificada por Degaspari et al. (1986). As pupas foram mantidas no tubo com a dieta até a fase adulta, de modo a evitar algum estresse causado pelo manuseio das mesmas, uma vez que em campo a fase de pupa ocorre dentro do colmo da cana. Os adultos foram transferidos para caixas de criação similar àquelas utilizadas para os insetos que eram oriundos de campo.

Para os testes foi utilizado o isolado de *B. bassiana* IBCB170, o qual causa maior taxa de mortalidade a *S. levis* (Simi, 2014). Este isolado foi oriundo do Banco do Laboratório de Controle Biológico do Centro Experimental Central do Instituto Biológico "Oldemar Cardim Abreu" – Campinas, São Paulo, Brasil. O isolado foi armazenado em tubo de falcon (50mL) e/ou placas de Petri (9 cm de diâmetro) sob temperatura de - 4 °C (freezer) no Banco de Entomopatógenos do

LCMAP. Para sua utilização, o isolado foi repicado em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e foi incubado em câmara BOD à temperatura de 28 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 h, por um período de 15 dias.

2.2. Encapsulamento de Isolados de *Beauveria bassiana*

As partículas, contendo o fungo, foram preparadas pelo método de gelificação iônica, que consistiu em liberar uma suspensão de alginato de sódio contendo o fungo em uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) (Santos et al. 2015). Uma suspensão do isolado IBCB 170 foi preparado na concentração de 10^8 conídios/mL, em seguida foi adicionado alginato de sódio na concentração de 2% e conduzido para agitação magnética por um período de 45 minutos para se obter uma mistura homogênea. Após este processo, a solução de alginato de sódio mais fungo foi inserida, com o auxílio de um conjunto seringa (50 mL) mais agulha, em uma solução de 0,1 mol. L^{-1} de cloreto de cálcio sob agitação em agitador magnético e nesta foi mantida por um período de 60 minutos. As micropartículas formadas foram armazenadas em recipiente estéril a 4 °C. A quantidade média inicial de esporos nas micropartículas com o fungo entomatogenico encapsulado foi estimada em 1×10^7 conídios mL^{-1} . Uma alíquota de partículas foi levada à estufa com temperatura de 27 °C até atingir 5% de umidade para comparação com as micropartículas úmidas (5%).

2.3 Patogenicidade de *Beauveria bassiana* a *Sphenophorus levis*

A patogenicidade do fungo a *S. levis* foi realizada a partir de testes usando microcápsulas secas e úmidas (sem processo de secagem em estufa) contendo o isolado de *B. bassiana* IBCB 170. Duas quantidades de microcápsulas de fungo encapsulado foram utilizadas: 0,05 g e 0,1 g. O teste foi dividido em seis tratamentos: T1 = 0,05 g de fungo encapsulado (Úmido); T2 = 0,1 g de fungo encapsulado (Úmido); T3 = 0,05 g de fungo encapsulado (Seco); T4 = 0,1 g de

fungo encapsulado (Seco); T5 = Testemunha (Insetos pulverizados com água deionizada) e T6 = Fungo não encapsulado.

Cada tratamento foi constituído de 10 repetições, tendo um adulto de *S. levis* por repetição. Os tratamentos que continham microcápsula (T1, T2, T3 e T4) foram condicionadas em uma placa de Petri (6 cm de diâmetro) com o inseto. No tratamento em que o fungo não foi encapsulado, os insetos foram pulverizados com uma suspensão de fungo na concentração de $2,5 \times 10^8$ conídios/ml, em seguida foram transferidos para placas de Petri de mesmo tamanho. Na testemunha os insetos foram pulverizados com água deionizada. Após um período de 24 horas foi inserido um tolete de cana (1 cm de diâmetro) nas placas. A troca da cana de açúcar, que servia de alimento foi realizada a cada cinco dias.

As avaliações se iniciaram a partir do sétimo dia após o contato do fungo com os insetos. Quando foi observada a morte dos insetos, estes foram transferidos para uma câmara úmida, com o intuito de verificar a esporulação do fungo. Esta técnica é utilizada para determinar se a morte dos insetos foi realmente causada pelo fungo ou se outros fatores desconhecidos estão envolvidos. Para isso, em uma placa de Petri (6 cm de diâmetro) esterilizada foi colocado um algodão umedecido com água deionizada e sobre ele colocado um papel filtro, com o inseto sobre o mesmo. Posteriormente, as placas foram acondicionadas em câmara do tipo B.O.D com temperatura de 27 ± 2 °C, umidade relativa média de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 h por um período de 48 horas ou até que houvesse a esporulação do fungo utilizado.

2.4. Efeitos da radiação ultravioleta em *Beauveria bassiana* encapsulada e não encapsulada

Para avaliação dos efeitos da radiação UV-A e UV-B em *B. bassiana*, porções de microcápsulas (úmidas) contendo fungo e o fungo não encapsulado foram expostos à luz ultravioleta (UV-A 400-315 nm/UV-B 315-280 nm) distantes 20 cm da fonte emissora da radiação em câmara escura. Pequenas quantidades foram retiradas com diferentes intervalos de tempo (0, 30, 60, 120, 240, 480 e 720 minutos). Estas microcápsulas foram acondicionadas em placas contendo

Ágar Batata Dextrose (BDA) e levadas para câmara climatizada para avaliação do desenvolvimento do fungo exposto a à radiação ultravioleta. Para a avaliação dos efeitos da luz ultravioleta em fungo não encapsulado, uma alíquota de 5 µL foi plaqueada em BDA e exposta à luz ultravioleta. As condições de temperatura foram as mesmas utilizadas para o fungo encapsulado, bem como os períodos de exposição. As colônias foram fotografadas no sétimo dia após a exposição e medidas com o auxílio do software Image J.

2.5. Análise estatística

O experimento de efeito da radiação UV foi conduzido esquema fatorial 7 × 2, sendo os resultados obtidos transformados em Raiz de x ($\sqrt{x}$) e comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para o teste de mortalidade as médias foram comparadas pelo intervalo de confiança (95% IC). Para a realização das análises foram utilizados os programas estatísticos SAS e SISVAR.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os bioensaios utilizados com o intuito de verificar o efeito da radiação UV-A (400-315 nm) e UV-B (315-280 nm) sobre o isolado IBCB 170 de *B. bassiana* mostraram que houve crescimento de colônia em todos os períodos de exposição do fungo à radiação, tanto para fungo encapsulado quanto para fungo não encapsulado. Foi possível observar que a faixa de radiação testada não foi letal para o fungo quando ele não estava encapsulado. Quando foi comparado o tamanho de colônia do fungo não encapsulado nos diferentes tempos de exposição apenas o período de 480 minutos (12,5 cm²) diferiu significativamente dos demais ($F = 15,39$; $P = <0,001$). Os tempos de exposição 30, 60, 120, 240 e 720 minutos apresentaram maior tamanho de colônia em relação ao tempo zero; porém estes não diferiram significativamente do mesmo. Para o fungo encapsulado, o tamanho de colônia não apresentou diferença significativa entre os tempos de exposição do fungo à radiação UV (Tabela 1).

Quando se compara o tamanho de colônia entre fungo encapsulado e não encapsulado em cada tempo de exposição à radiação UV, observou-se que nos tempos de 30, 240 e 480 minutos ocorreram diferenças significativas. Nos tempos de 30 e 480 minutos o fungo não encapsulado apresentou maior tamanho de colônia em relação ao encapsulado. Para o tempo 240 minutos o maior tamanho de colônia foi observado no fungo encapsulado, diferindo significativamente do não encapsulado, e nos demais tempos não houve diferença significativa (Tabela 1).

Tabela 1: Tamanho médio da colônia (cm²) ± EP do fungo *Beauveria bassiana* isolado IBCB 170 não encapsulado e encapsulado exposto à radiação UV-A e UV-B em diferentes períodos.

Tempo de exposição (min)	Fungo não encapsulado	Fungo encapsulado	F	P
0	2,9 ± 0,56 bA	2,6 ± 0,65 aA	0,03	0,863
30	7,9 ± 2,92 bA	2,2 ± 0,30 aB	8,32	< 0,05
60	5,5 ± 0,80 bA	5,6 ± 0,61 aA	0,002	0,965
120	4,4 ± 1,18 bA	6,3 ± 0,82 aA	0,91	0,342
240	3,9 ± 0,49 bB	7,9 ± 3,00 aA	4,13	< 0,05
480	12,5 ± 8,39 aA	4,9 ± 0,67 aB	15,39	< 0,001
720	4,9 ± 0,60 bA	3,8 ± 6,28 aA	0,36	0,551

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Scott-Knott e as seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem pelo teste F ($P < 0,05$)

Quando expostos à radiação ultravioleta, fungos entomopatogênicos apresentam mecanismos de proteção e de reparação dos danos causados pela exposição (Hirao et al., 2000; Zhou e Elledge, 2000). No presente estudo, o isolado testado, encapsulado e não encapsulado, mostrou variação de tolerância quando exposto em diferentes tempos à radiação UV.

Em todos os tempos de exposição, o fungo apresentou maior tamanho de colônia em relação a testemunha, sem exposição à radiação, embora em alguns casos não tenha apresentado diferença significativa. É provável que mesmo com

os danos causados pela exposição, o isolado apresentou mecanismo de reparação a estes danos, conseguindo reverter os danos iniciais causados pela radiação. Este também pode ser um dos fatores que fez com que no período de exposição 480 minutos foi o tempo que apresentou maior tamanho de colônia do fungo não encapsulado

As principais enzimas envolvidas nesse processo de restauração e danos são as fotoliasas, as quais utilizam a luz como fonte de energia para a remoção dos dímeros de pirimidina formados no DNA das células expostas à radiação (Kao et al., 2005). A produção destas enzimas pelo isolado IBCB 170 pode ser a explicação para a observação da germinação dos conídios primeiramente no fungo encapsulado que não no fungo não encapsulado, mostrando a capacidade de regeneração dos danos causados pela radiação ao isolado.

Para fungos filamentosos, a maioria dos estudos mostram redução no crescimento quando estes são expostos à radiação UV, o que é mais significativo e evidente, quando o tempo de exposição aumenta (Fargues et al., 1996; Costa et al., 2012). No entanto, no presente estudo, esta redução não foi observada. Estas informações podem ser úteis para indicar que o isolado IBCB 170 pode apresentar uma tolerância à exposição UV a qual foi submetido. No entanto, estudos com emissão de espectros maiores de radiação UV devem ser testados neste mesmo isolado para que se possa afirmar com maior acurácia essa tolerância. Mesmo que o isolado testado tenha apresentado uma tolerância a radiação UV, a qual foi exposto, o processo de encapsulamento pode ser um importante aliado em uma futura formulação deste isolado, pois outros fatores como maior espectro, temperaturas elevadas e umidade podem afetar a patogenicidade e virulência do isolado.

Embora o uso de técnicas de encapsulamento ajude a prolongar a vida útil, bem como aumente a tolerância de fungos a fatores como radiação UV, temperatura e umidade, se faz necessário mais estudos com o intuito de conhecer mais da interação de entomopatógenos com os polímeros e matérias aos quais o mesmo pode ser encapsulado, bem como a interação desta formulação com o hospedeiro do fungo.

No teste de patogenicidade do isolado IBCB170 de *B. bassiana*, não encapsulado e encapsulado, a *S. levis*, houve diferenças significativas na mortalidade dos insetos. Pode ser observada uma mortalidade de 100% quando o fungo não foi encapsulado, sendo a maior mortalidade observada com partículas úmidas (60%) para ambas as quantidades de cápsulas utilizadas (0,05 e 0,1 g), sendo que 75% dos insetos tiveram a morte causada pelo fungo. Já para as partículas secas, nas quantidades de 0,05 g 0,1 g a mortalidade observada não diferiu significativamente das partículas úmidas. Com o uso de partículas secas na quantia de 0,05 g de partículas a mortalidade observado foi de 30%, porém apenas 25% destes insetos apresentou mortalidade causada pelo fungo. Quando a quantia de partículas foi de 0,1 g a mortalidade observada foi de 40%, sendo que aproximadamente 83% destes insetos foram mortos pela ação do fungo (Tabela 2).

Tabela 2: Mortalidade verificada ($\pm$ EP e IC) e mortalidade confirmada (EP e IC) (%) de *Sphenophorus levis* por *Beauveria bassiana* encapsulado e não encapsulado com partículas úmidas e secas.

Tratamentos	Mortalidade verificada (%)	Mortalidade confirmada (%)
0,05 g FEU	60,0 $\pm$ 20,0 (40-80) b	75,0 $\pm$ 25,0 (100-50) ab
0,1 g FEU	60,0 $\pm$ 20,0 (40-80) b	75,0 $\pm$ 25,0 (100-50) ab
0,05 g FES	30,0 $\pm$ 10,0 (20-40) b	25,0 $\pm$ 25,0 (0-50) ab
0,1 FES	40,0 $\pm$ 20,0 (20-60) b	83,3 $\pm$ 16,6 (66,6-100) ab
Testemunha	10,0 $\pm$ 10,0 (0-20) bc	0,0 $\pm$ 0,0 (0-0) c
FNE	100,0 $\pm$ 0,0 (100-100) a	100,0 $\pm$ 0,0 (100-100) a

Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo intervalo de confiança (95% IC). FEU = Fungo encapsulado úmido e FES = seco; FNE = Fungo não encapsulado.

Em relação ao tempo de esporulação do fungo no hospedeiro, consequentemente a morte deste, no fungo não encapsulado ocorreu 7 dias após a aplicação, já para o fungo encapsulado o tempo foi superior a 20 dias. Essa diferença no período de esporulação entre ambas as formulações já era esperada, uma vez que o tubo germinativo do fungo não encapsulado não encontrou a barreira da partícula para vencer antes de realizar a infecção do

hospedeiro, o que causou um processo de infecção mais lento (Rodrigues et al., 2016).

A menor taxa de mortalidade causada pelo fungo encapsulado pode estar relacionada as perdas que ocorrem durante o processo de encapsulamento, pois foi observado neste estudo uma perda de 10% na quantidade de conídios no processo de encapsulamento. Outro fator que pode influenciar na infecção do hospedeiro por um fungo encapsulado é a porosidade das partículas, visto que aquelas feitas com alginato de sódio geralmente apresentam alta porosidade, resultando em altos níveis de liberação do ingrediente ativo que ela contém. A liberação mais rápida dos conídios também pode estar relacionada à alta concentração de conídios utilizados ou mesmo à fragilidade da estrutura das cápsulas causada pela alta carga de fungos a que o material foi submetido (Batista et al., 2013). Os mesmos autores relataram que, quando a capacidade de encapsulamento foi extrapolada, a estabilidade das partículas foi afetada e houve menor taxa de intumescimento, o que pode resultar em uma rápida liberação dos conídios do interior da partícula. Isso não foi observado neste estudo, onde a germinação dos conídios no hospedeiro foi mais lenta em relação ao fungo não encapsulado. Assim, diferentes concentrações de fungos e do polímero a ser utilizado devem ser avaliadas para obter-se um equilíbrio entre a estabilidade da partícula e a liberação do fungo.

Outro fator importante a ser considerado é que a interação da formulação (fungo encapsulado) com a cutícula do inseto. Essas interações entre este tipo de formulação e a cutícula dos insetos ainda são pouco conhecidas e podem ser influenciadas de acordo com o tipo de formulação (Rodrigues et al., 2016), tipos de matérias que serão utilizados para o encapsulamento, técnicas de preparo das partículas, bem como a espécie e a fase de desenvolvimento do inseto que está sendo estudado.

A suscetibilidade de insetos-pragas a fungos entomopatogênicos encapsulados precisa ser mais bem estudada. Esta escassez de trabalhos, pode estar atrelada ao fato de que a maioria dos trabalhos focam apenas nos estudos de formulação para redução e ou amenização dos efeitos de fatores abióticos no desenvolvimento e na eficiência destes agentes de controle microbiano.

Portanto, estudos que demonstrem a patogenicidade e virulência de formulações de encapsulados a insetos pragas são de suma importância para que este tipo de formulações esteja disponível para uso agrícola.

4. CONCLUSÕES

O encapsulamento do isolado IBCB 170 de *B. bassiana* não reduz os efeitos da radiação UV-A e UV-B em relação ao fungo não encasulado.

Há menor mortalidade de *S. levis* quando se usa fungo encapsulado.

5. REFERÊNCIAS

Alves SB (1998) Pathology and Microbial Control: Advantages and Disadvantages. In: Alves SB (Ed.), **Controle Microbiano de Insetos**, 2nd Edition, Fealq, Piracicaba, pp. 21-38.

Alves SB (1998). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1163

Badilla FF, Alves SB (1991) Control del picudo de la caña de azúcar *Sphenophorus levis* Vauire (Col.: Curculionidae) con *Beauveria bassiana* y *Beauveria brogniartii* en condiciones de laboratorio y campo. **Revista Interamericana de Ciencias Agrícolas**, 4: 237-243

Batista DPC, Souza RS, Santos-Magalhães NS, Sena-Filho JG, Teodoro AV, Grilo LAM, Dornelas CB. (2013) Formulações bioinseticidas de *Beauveria bassiana* a base de nanocompósito polimérico visando o controle de praga do coqueiro. **12º Congresso Brasileiro de Polímeros**, 12, Florianópolis 2013

Bernardo CDC. 2016 **Conídios e blastosporos de *Metarhizium* spp. e *Beauveria bassiana*: virulência para *Rhipicephalus microplus* e resposta ao calor e à radiação UV-B**. 97 p. Tese (Medicina Tropical e Saúde) Universidade Federal de Goiás.

Braga GU, Rangel DE, Fernandes ÉK, Flint SD, Roberts DW. (2015). Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. **Current genetics**, 61: 405-425.

Burges HD. (1998) Formulation of Microbial Pesticides. **Springer**, Dordrecht.

Canali MC (2017). **Prospecção de fungos entomopatogênicos para o controle biológico de formigas cortadeiras**. 117 f. Dissertação (Ciências Biológicas: Área de Microbiologia Aplicada) Universidade Estadual Paulista.

Chelico L, Khachatourians GG. (2008). Isolation and characterization of nucleotide excision repair deficient mutants of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 98: 93-100,

Costa LB, Rangel DEN, Morandi MAB, Bettiol W. (2012) Impact of UV-B Radiation on *Clonostachys rosea* Germination and Growth. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28, 2497-2504.

Degaspari N, Botelho PSM, Almeida LC, Castilho HJ, (1987) Biologia de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Col.: Curculionidae), em dieta artificial e no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 22: 553-558.

Dinardo-Miranda LL (2014) *Sphenophorus levis*. In: Dinardo-Miranda LL **Nematoides e pragas da cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico. 7: 210-262.

Dos Santos MD, Duarte, ME, Valente ECN, Barbosa TJ A, Silva ES (2016). Eficiência de isolados comerciais de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok (Hypocreales: Cordycipitaceae, Clavicipitaceae) sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Revista Brasileira de Biociências**, 14: 2

Fargues J, Goettel MS, Smits N, Ouedraogo A, Vidal C, Lacey LA, Lomer CJ Rougier M. (1996) Variability in Susceptibility to Simulated Sunlight of Conidia among Isolates of Entomopathogenic Hyphomycetes. **Mycopathologia**, **135**, 171-181.

Faria MR, Wraight SP (2007) Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A Comprehensive List with Worldwide Coverage and International Classification of Formulation Types. **Biological Control**, 43, 237-256.

Fernandes EKK, Bittencourt VREP, (2008). Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental & applied acarology** 46: 71–93.

Friedberg EC, Walker GC, Siede W (1995). **DNA Repair and Mutagenesis**

Girón-Pérez K, Nakano O, Silva AC, Oda-Souza M (2009). Atração de adultos de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) a fragmentos vegetais em diferentes estados de conservação. **Neotropical Entomology**. 38: 1-6.

Hideg E, Jansen MAK, Strid A (2013). UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? **Trends in plant science**, 18:107–115.

Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Mak TW (2000) DNA damage-induced activation of p53 by checkpoint kinase Chk2. **Science** 287:1824-1827.

Klein LAS (2017). **Secretoma de Beauveria bassiana relacionado à infecção no carrapato bovino Rhipicephalus microplus**. 52 f. Dissertação (Biotecnologia). Centro Universitário UNIVATES.

Michereff Filho M, Faria M, Wraight SP, Silva KFAS (2009) Micoinsecticides and Micoacaricides in Brasil: As We Are after Four Decades? **Arquivos do Instituto Biológico**, 76: 769-779.

Oliveira RCD, Alves LFA, Neves PMOJ (2002). Susceptibility of *Oligonychus yothersi* (Acari: Tetranychidae) to the fungus *Beauveria bassiana*. **Scientia Agricola**, 59: 187-189.

Pagliarani VD (2012) **Formulação e dose do fungo *Beauveria bassiana* no controle de *Sphenophorus levis* e efeito em pragas de solo em cana-de-açúcar**. 23f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Agronomia) – Centro Universitário Moura Lacerda, Ribeirão Preto

Pinto APF, Batista Filho A, De Almeida JEM, Wenzel IM (2013). Patogenicidade de *Beauveria bassiana* ao psíldeo *Diaphorina citri* e compatibilidade do fungo com produtos fitossanitários. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 47:1673-1680.

Polanczyk RA, Almeida LC, Padulla L, Batista Alves S (2004). Pragas de cana-de-açúcar x métodos alternativos de controle. **Revista de biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 33: 14-17

Precetti AACM, Arrigoni EB (1990). **Aspectos biológicos e controle do besouro *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar**. Boletim Técnico Coopersucar – Edição Especial. 15p

Prestes TMV, Pietrowski V, Zanini A, Formentini MA, Alves LFA (2015). Natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.(Moniliales: Moniliaceae) and pathogenicity on *Protortonia navesi* Fonseca (Hemiptera: Monophlebidae) in cassava plantation, in Marechal Cândido Rondon, Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, 82:1-4.

Rangel DE, Anderson AJ, Roberts DW (2008). Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycological research**, 112: 1362-1372.

Rangel DE, Braga GU, Anderson AJ, Roberts DW (2005). Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. **Journal of invertebrate pathology** 90: 55-58.

Rangel DEN, Anderson AJ Roberts DW. (2008) Evaluating Physical and Nutritional Stress during MycelialGrowth as Inducers of Tolerance to Heat and UV-B Radiation in *Metarhizium anisopliae* Conidia. **Mycological Research**, 112, 1362-1372.

Rangel DEN, Bytler MJ, Torabinejad J, Anderson AJ, Braga GUL, Day AW, Roberts DW (2006). Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. **Journal of Invertebrate Pathology** 93: 170- 182.

Ribeiro MM (2013). **Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., em *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae), em condições de laboratório e de campo.** 69 f. Dissertação (Engenharia Florestal, área de concentração em Silvicultura) Universidade Federal do Paraná.

Rodrigues IW, Forim MR, Da Silva MFGF, Fernandes JB, Batista Filho A (2016). Effect of ultraviolet radiation on fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, pure and encapsulated, and bio-insecticide action on *Diatraea saccharalis*. **Advances in Entomology**, 4: 151

Salvador Neto N (2012). **Doses dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* GR no controle de *Sphenophorus levis* e corós em cana-de-açúcar.** 25f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Agronomia) – Centro Universitário Moura Lacerda, Ribeirão Preto

Santos GF, Locatelli GO, Coêlho DA, Botelho PS, Amorim MS de, Vasconcelos TCL de, Bueno LA (2015) Factorial design, preparation and characterization of new beads formed from alginate, polyphosphate and glycerol gelling solution for microorganism microencapsulation. **Journal of Sol-Gel Science and Technology** 75:345–352

Silva RP (2014). **Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL sobre cupins urbanos.** Trabalho de conclusão de curso. (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba.

Simi LD (2014). **Controle de *Sphenophorus levis* e *Conotrachelus humeropictus* pelo uso combinado de nematoides e fungos entomopatogênicos.** 107 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

SINGH P (1978) Artificial diets for insects, mites and spiders. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 23:100.

Svedese VM, Silva APDAP, Lopes RDS, Santos JFD, Lima EÁDLA (2012). Action of entomopathogenic fungi on the larvae and adults of the fig fly *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). **Ciência Rural**, 42: 1916-1922.

Tamai MA, Alves SB, Neves PJ (1999). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against *Tetranychus urticae* Koch. **Scientia Agricola**, 56: 285-288.

Terán F, Precetti AACM (1982). *Sphenophorus levis* e *Metamasius hemipterus* como pragas da cana-de açúcar. **Boletim Técnico Copersucar**. 18: 24-26.

Vega FE, Goettel MS, Blackwell M, Chandler D, Jackson MA, Keller S, Koike M, Maniania NK, Monzón A, Ownley BH, Pell JK, Rangel DEN, Roy HE (2009).

Fungal Entomopathogens: New Insights on Their Ecology". **Fungal Ecology**. 2: 149-159

Vemmer M, Patel AV Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. **Biological Control**, v. 67, n. 3, p. 380-389, 2013.

Zambiazzi EV, Guilherme SR, Corassa JDN, Bonaldo SM, Zuffo AM, Soares IO, Oliveira DD (2016). Patogenicidade de *Beauveria bassiana* no controle in vitro da lagarta-da-espiga do milho (*Helicoverpa zea*). **Revista de Ciências Agrárias**, 39: 89-94.

Zhou BBS, Elledge SJ (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature** 408: 433-439.

CAPÍTULO 3 - COMPATIBILIDADE *IN VITRO* DE INSETICIDAS REGISTRADOS PARA O CONTROLE DE PRAGAS DE SOLO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM *Beauveria bassiana*

RESUMO - A mistura de produtos químicos e biológicos no tanque de pulverização é cada vez mais frequente e a compatibilidade entre eles precisa ser avaliada para viabilizar o controle de espécies pragas na agricultura. Este trabalho foi realizado com o intuito de verificar a compatibilidade de inseticidas, recomendados para o controle *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) na cultura da cana-de-açúcar, e o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* ((Hypocreales: Cordycipitaceae) IBCB 170, considerado muito promissor para o controle dessa praga. Nos testes de compatibilidade *in vitro*, 13 inseticidas foram testados em três doses (mínima, média e máxima) misturando-os, isoladamente, ao meio de cultura ainda líquido e transferindo-os para placa de Petri, onde uma alíquota de 5 µL do fungo foi inoculada no centro da placa. O material foi acondicionado em B.O.D e sete dias depois foram avaliados os parâmetros crescimento vegetativo, esporulação e viabilidade de conídios. Para determinar a compatibilidade entre os inseticidas e *B. bassiana* foi utilizada a fórmula matemática da compatibilidade de produtos fitossanitários e entomopatógenos. O inseticida Evidence® 700 inibiu o desenvolvimento do fungo nos parâmetros avaliados. O crescimento vegetativo e a esporulação apresentaram variação entre as doses testadas de cada produto. A germinação de conídios foi inversamente proporcional com a dose de cada produto testado. Somente os inseticidas Singular® e Diamante® foram compatíveis com o isolado de *B. bassiana* na dose recomendada, enquanto o primeiro foi compatível na dose máxima da dose recomendada.

Palavras chave: Controle Microbiano, Inseticidas, MIP, *Sphenophorus levis*

CHAPTER 3 - *IN VITRO* COMPATIBILITY OF REGISTERED INSECTICIDES FOR THE CONTROL OF SUGAR CANE SOIL PESTS WITH *Beauveria bassiana*

ABSTRACT - Mixing chemical and biological products in the spray tank has become more frequent, and the compatibility between them needs to be evaluated to enable the control of pest species in agriculture. This work was carried out to verify the compatibility between insecticides, recommended for the control of *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) in sugarcane crops, and the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) IBCB 170, considered very promising to control this pest. In the *in vitro* compatibility trials, 13 insecticides were tested in three doses (minimum, medium and maximum) by mixing them individually into a still liquid culture medium, and then transferred to Petri dishes, where an aliquot of 5 µL of the fungus was inoculated in the center of the dish. The material was placed in B.O.D. and, seven days later, the following parameters vegetative growth, sporulation and viability of conidia were evaluated. The compatibility between insecticides and *B. bassiana* was determined by using a mathematical formula for the compatibility of phytosanitary and entomopathogenic products. Evidence® 700 insecticide inhibited development fungus in the evaluated parameters. Vegetative growth and sporulation varied among the tested doses of each product. Conidial germination was inversely proportional to the dose of each product tested. Both insecticides Singular® and Diamante® were compatible with *B. bassiana* isolate at the recommended dose, only, and the first was compatible at twice the recommended dose.

Keywords: Microbial control, insecticides, IPM, *Sphenophorus levis*

1. INTRODUÇÃO

Fungos entomopatogênicos são importantes agentes de controle microbiano e considerados um dos mais afetados por agrotóxicos. Entretanto, devido à importância desses em programas de manejo integrado de pragas (MIP) (Lacey, 2017) e do seu uso em mistura de tanque com agrotóxicos, estudos de compatibilidade são necessários. Os agrotóxicos podem afetar o crescimento, a esporulação e a virulência de fungos entomopatogênicos utilizados no controle de insetos-pragas (Rashid et al., 2010; Hernandez et al., 2012; Tkaczuk et al., 2012; 2015; Pelizza et al., 2015).

Testes de compatibilidade *in vitro* de agrotóxicos com fungos entomopatogênicos descrevem os possíveis efeitos negativos ou positivos que podem ocorrer quando estes são aplicados em associação, especialmente em casos em que é realizada a mistura (Rossi-Zalaf et al., 2008). Os resultados destes estudos podem ser utilizados de base para o desenvolvimento de estratégias de MIP com associação de bioinseticidas a base de fungos entomopatogênicos e inseticidas para o controle de pragas (Fiedler e Sosnowska, 2017). Estes estudos são realizados desde os primeiros programas de controle biológico com estes patógenos (Hall e Dunn, 1959; Jaques e Patterson, 1962; Ignoffo et al., 1975; Alves e Rigitano; Camargo, 1980; Depieri e Martinez; Menezes Júnior, 2005; Wenzel et al., 2008; Pinto et al., 2012; Oliveira et al., 2016), geralmente utilizando-se diversas técnicas, em especial o método de contato entre o fungo e o agrotóxico (Pérez-González e Sánchez-Peña, 2017; Da Costa et al., 2018). Entretanto, a falta de padronização das metodologias dificulta a comparação dos resultados.

Diversos trabalhos descrevem resultados promissores em relação a compatibilidade de ingredientes ativos com as principais espécies de fungos entomopatogênicos, tais como acetamiprid, imidacloprid e tiametoxam, os quais são enquadrados no grupo químico neonicotinoide (Gassen et al., 2008; Wenzel et al., 2008; Botelho e Monteiro, 2011; Schumacher e Poehling, 2012; Cintra et al., 2013; Castellanos González et al., 2013; Santos et al., 2013; Da Silva et al., 2013; Niassy et al., 2014; Shewale e Mohite, 2018; Pérez-González e Sánchez-Peña, 2017; Fiedler e Sosnowska, 2017; Da Costa et al., 2018). Estudos de

compatibilidade entre o ingrediente ativo Azadiractina, caracterizado como um Tetranortriterpenoide, e os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* reportaram a possibilidade de associação entre ambos para o uso contra diferentes espécies de insetos-praga (Depieri e Martinez; Menezes Júnior, 2005; Santos et al., 2009; Islam e Castle; Ren, 2010; Pires et al., 2010; Islam et al., 2011; Hernández et al., 2012; Ribeiro et al., 2012; Rocha et al., 2012; Duarte et al., 2016; Halder, et al., 2017).

Algumas pesquisas estudando a “interação” entre organofosforados e fungos entomopatogênicos mostraram vários resultados positivos de compatibilidade a diferentes ingredientes ativos, mas também muitos relatos relacionados à incompatibilidade, revelando divergências entre as metodologias utilizadas, bem como entre as dosagens utilizadas (Anhalt et al., 2010; Archana e Ramaswamy, 2012; Pinto et al., 2012; Cintra et al., 2013; Santos et al., 2013; Silva et al., 2013; Bernal e Álvarez; Mogollón, 2014; Niassy et al., 2014; Pérez-González e Sánchez-Peña, 2017; Da Costa et al., 2018). Para ingredientes ativos relacionados ao grupo dos piretroides, a alta toxicidade destes produtos a fungos entomopatogênicos foi evidenciada (Silva et al., 2006; Archana e Ramaswamy, 2012; Niassy et al., 2012; Oliveira et al., 2016; Pérez-González e Sánchez-Peña, 2017; Meyling et al., 2018). Isso reflete a necessidade de estudos mais elaborados sobre a associação entre fungos e diferentes grupos químicos.

Pesquisas objetivando evidenciar o sinergismo entre fungos entomopatogênicos e inseticidas visando o controle de insetos-pragas têm sido desenvolvidas e resultados promissores da associação entre esses agentes de controle vêm sendo apresentados (Jaramillo et al., 2005; Shapiro-Ilan et al., 2011; Shakir et al., 2015; Yii et al., 2015; Ashraf et al., 2017; Shewale e Mohite, 2018).

O controle de insetos-pragas exige inovação humana constante (Hill, 1983). O ataque simultâneo ou “ataque duplo”, uso de duas ou mais técnicas de controle, ao inseto alvo é um método que se apresenta promissor para o seu controle. Essa abordagem de “ataque duplo” pode resultar em maior taxa de mortalidade comparado ao uso dos métodos de controle de pragas de forma

independente (Hiromori e Nishigaki, 2001; Bitsadze et al., 2013). Para obter-se resultados satisfatórios da abordagem combinada visando melhorar o controle de pragas, uma melhor compreensão dos mecanismos sinérgicos entre inseticidas e entomopatógenos é requerida.

A utilização de mais de uma técnica de controle é o mais indicado para o controle de *S. levis*, o qual tem se tornado uma das principais pragas na cultura da cana-de-açúcar nos últimos anos. Esta praga pode causar perdas de produção significativas e até mesmo a inviabilização das áreas atacadas (Precetti e Arigoni, 1990; Pinto et al., 2009; Dinardo-Miranda, 2014). Com o intuito de verificar a compatibilidade de inseticidas e do fungo entomopatogênico *B. bassiana* para o controle de pragas de solo na cultura da cana-de-açúcar, realizou-se o presente estudo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos (LBCI), Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), Campus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

Nesse estudo utilizou-se o isolado de *B. bassiana* IBCB 170, obtido do banco de isolados do Laboratório de Controle Biológico do Centro Experimental Central do Instituto Biológico "Oldemar Cardim Abreu" em Campinas, São Paulo. Este isolado foi considerado promissor para o controle de *S. levis* Simi (2014). O isolado foi multiplicado em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar) e mantido em câmara do tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand), aclimatizada em $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 h.

A escolha dos inseticidas (Tabela 1) foi baseada na recomendação à cultura da cana-de-açúcar, sendo utilizados inseticidas indicados para o controle de *S. levis* e para controle de outras pragas de solo. A dose mínima e máxima, recomendadas pelo fabricante, mais a média entre as duas (dose média) foram utilizadas nos bioensaios.

Tabela 1. Produtos utilizados para testes de compatibilidade com o isolado IBC 170 de *Beauveria bassiana*.

Nome comercial	Tipo de formulação	Princípio ativo	Grupo químico	Concentração		
				Mínima	Média	Máxima
⁶ Singular BR®	SC	Fipronil	Pirazol	0,3L ha ⁻¹	0,5L ha ⁻¹	0,7L ha ⁻¹
¹ Diamante®	SC	Imidacloprid	Neonicotinoide	0,75 L ha ⁻¹	0,82L ha ⁻¹	1,0L ha ⁻¹
² Actara®	WG	Tiametoxam	Neonicotinoide	0,4 kg ha ⁻¹	0,7kg ha ⁻¹	1kg ha ⁻¹
³ Engeo Pleno®	SC	Tiametoxam + Lambda-cialotrina	Neonicotinoide + Piretroide	1,5 L ha ⁻¹	2,0 kg ha ⁻¹	2,5kg ha ⁻¹
¹ Talisman®	EC	Bifentrina + Carbosulfano	Piretroide + Metilcarbamato de Benzofuranila	3,0 L ha ⁻¹	4,0 L ha ⁻¹	5,0 L ha ⁻¹
³ Imidacloprid Nortox	SC	Imidacloprid	Neonicotinoide	0,720 L ha ⁻¹	0,840 Lha ⁻¹	0,960L ha ⁻¹
¹ Marshal® Star	EC	Carbosulfano	Metilcarbamato de Benzofuranila	3,5 L ha ⁻¹	4 L ha ⁻¹	4,5 L ha ⁻¹
³ Evidence® 700	WG	Imidacloprid	Neonicotinoide	0,2 Kg ha ⁻¹	0,4 Kg ha ⁻¹	0,8 Kg ha ⁻¹
⁵ Regente® 800	WG	Fipronil	Fenilpirazol	0,25 kg ha ⁻¹	0,375 Kg ha ⁻¹	0,5 Kg ha ⁻¹
⁵ Altacor®	WG	Clorantiraniliprole	Antranilamida	0,3 Kg ha ⁻¹	0,375 Kg ha ⁻¹	0,4 Kg ha ⁻¹
¹ Capture®	EC	Bifentrina	Piretroide	0,3 L ha ⁻¹	0,450 L ha ⁻¹	0,6 L ha ⁻¹

*Volume de calda: 1 = 100 L ha⁻¹; 2 = 150 L ha⁻¹; 3 = 175 L ha⁻¹; 4 = 225 L ha⁻¹; 5 = 300 L ha⁻¹.

Para os bioensaios foi utilizada a metodologia proposta por Alves et al. (1998). Esta metodologia visa avaliar o crescimento da colônia (crescimento vegetativo) e a produção de esporos (esporulação). Esta metodologia consiste em utilizar meio de cultura BDA diluindo-se 42 g em um litro de água deionizada. Após a diluição realizou-se a autoclavagem- durante 15 minutos ou até atingir uma temperatura de 120°C.

Para a mistura dos inseticidas ao meio de cultura, aguardou-se a temperatura do meio atingir temperatura de 45°C, a qual o mantém na forma líquida e não afeta as propriedades químicas dos produtos (Botelho e Monteiro, 2011). Após a homogeneização do meio com o inseticida, 10 mL de meio + inseticida foram vertidos em placas de Petri (9 cm de diâmetro), previamente autoclavadas, totalizando-se 10 repetições por tratamento. Cada tratamento consistiu em uma dose dos inseticidas mais o isolado selecionado. Quando ocorreu a solidificação do meio, inoculou-se 5,0 µL de conídios de *B. bassiana* no centro da placa. Após a inoculação as placas foram vedadas com filme PVC e acondicionadas em câmara de germinação por um período de sete dias com

temperatura de 27 ± 2 °C, umidade relativa média de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 h.

Após sete dias foi realizada a medição das colônias. Para estas medições, fotografou-se todas as colônias individualmente e, com o auxílio do software ImageJ, as colônias foram mensuradas. Posteriormente as medições, realizou-se a contagem dos conídios da colônia retirada do meio de cultura. Esta foi acondicionada em tubos do tipo Falcon com 10 mL de água deionizada e autoclavada. Esta suspensão foi homogeneizada e dela foi retirada uma pequena alíquota para visualização das estruturas reprodutivas com o auxílio de microscópio ótico (Bel Photonics) e câmara de Neubauer (100 x de aumento).

Para a verificação da germinação (viabilidade) do fungo foi utilizado a técnica da lâmina de microscópio (Marques et al., 2004). Neste teste foram utilizadas lâminas de microscópio previamente esterilizadas, posteriormente foi colocado uma quantia de meio de cultura referente a cada tratamento sobre a mesma e, após solidificação, foi inoculado uma alíquota de 5,0 µL. Para facilitar a identificação do local onde o fungo foi inoculado, realizou-se uma demarcação do local por meio de um círculo (Marques et al., 2004). Cada tratamento foi composto por 5 repetições. Com o auxílio de microscópio ótico (Bel Photonics) com 10 x de aumento, quantificou-se o número de esporos germinados e não germinados após um período de 24 horas, obtendo-se então o percentual (%) de germinação em cada tratamento.

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, sendo os dados obtidos submetidos à análise de variância (ANOVA). As variáveis analisadas em cada tratamento foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a padronização da compatibilidade foi utilizado a seguinte equação:

$$IB = 47 (CV) + 43 (ESP) + 10(GER)/100 \quad (1)$$

Onde, IB = índice biológico; CV = porcentagem de crescimento vegetativo da colônia após sete dias, em relação ao controle; ESP = porcentagem de esporulação da colônia após sete dias, em relação ao controle; GER =

porcentagem de germinação dos conídios após 24 horas, proposta por Rossi-Zalaf et al. (2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos inseticidas utilizados nos testes de compatibilidade, apenas em Evidence[®]700 WG (Imidacloprid) não foi observado desenvolvimento do fungo em nenhum dos parâmetros avaliados para nenhuma das doses (Tabela 2 3 e 4). Para o parâmetro crescimento vegetativo (CV), observou-se que todos os inseticidas, exceto Talisman[®] (Bifentrina + Carbosulfano) (1,21 cm²), Capture[®] (Bifentrina) (0,74 cm²) e Marshal Star[®] (Carbosulfano) (0,11 cm²) não permitiram CV do fungo, cujos valores foram próximos ou iguais a zero na dose media recomendada (Dose 1). Para a dose media recomendada os inseticidas Capture[®], Marshal Star[®] e Engeo Pleno[®] não permitiram o desenvolvimento do fungo. Os resultados observados para os inseticidas Actara[®] (Tiametoxam), Altacor[®] (Clorantraniliprole) e Talisman[®] (3,40; 2,52 e 0,33 cm² respectivamente) não diferiram significativamente entre si, apresentando diferenças significativas no tamanho da colônia para os demais produtos, nos quais houve crescimento vegetativo do fungo. No tratamento com o inseticida Diamante[®] (Imidacloprid) (11,19 cm²) houve maior tamanho de colônia do fungo. Para dose máxima recomendada (Dose 3), os valores com observados para os produtos Diamante[®], Singular[®] e Actara[®] (9,00; 7,19 e 9,14 cm², respectivamente) não diferiam significativamente da testemunha diferindo-se dos demais produtos. O inseticida Talisman[®] inibiu o CV, assim como aqueles citados na dose anterior (Tabela 3).

Tabela 2. Viabilidade dos conídios (%) $\pm$ EP do isolado IBCB 170 de *Beauveria bassiana* em contato com inseticidas registrados para o controle de pragas de solo na cultura da cana-de-açúcar por 24 horas.

Produto	Dose mínima	Dose média	Dose máxima	F _(gl)	P
Testemunha	100,0 $\pm$ 0,00 Aa	100,0 $\pm$ 0,00 Aa	100,0 $\pm$ 0,00 Aa	0,00 _(2,12)	> 0,05
Actara®	64,4 $\pm$ 18,80 BCda	29,9 $\pm$ 3,25 Bab	2,9 $\pm$ 1,47 Db	7,77 _(2,12)	0,0068
Engeo Pleno®	22,8 $\pm$ 7,33 EFGa	0,0 $\pm$ 0,00 Bb	0,0 $\pm$ 0,00 Db	9,68 _(2,12)	0,0031
Singular®	59,3 $\pm$ 6,13 CDa	24,0 $\pm$ 14,69 Bb	0,0 $\pm$ 0,00 Db	10,52 _(2,12)	0,0023
Diamante®	93,9 $\pm$ 0,81 ABa	20,0 $\pm$ 20,00 Bb	0,0 $\pm$ 0,00 Db	18,33 _(2,12)	0,0002
Altacor®	48,9 $\pm$ 8,92 CDEa	20,0 $\pm$ 20,00 Bab	0,0 $\pm$ 0,00 Db	3,78 _(2,12)	0,0532
Imidacloprid Nortox®	78,0 $\pm$ 3,89 ABCa	0,0 $\pm$ 0,00 Bb	0,0 $\pm$ 0,00 Db	402,66 _(2,12)	0,0001
Regente® 800	96,7 $\pm$ 1,31 ABa	31,2 $\pm$ 4,63 Bb	10,8 $\pm$ 3,33 Cc	175,73 _(2,12)	0,0001
Talismã®	8,8 $\pm$ 2,41 FGa	2,9 $\pm$ 0,82 Bb	0,0 $\pm$ 0,00 Db	9,18 _(2,12)	0,0038
Capture®	38,7 $\pm$ 9,31 DEFa	21,3 $\pm$ 3,91 Bab	0,0 $\pm$ 0,00 Db	11,07 _(2,12)	0,0019
Marshal® Star	0,0 $\pm$ 0,0 Ga	0,0 $\pm$ 0,00 Ba	0,0 $\pm$ 0,00 Da	0,00 _(2,12)	> 0,05
Evidence® 700	0,0 $\pm$ 0,0 Ga	0,0 $\pm$ 0,00 Ba	0,0 $\pm$ 0,00 Da	0,00 _(2,12)	> 0,05
F _(gl)	29,72 _(12,52)	11,91 _(12,52)	565,82 _(12,52)		
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001		

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 3. Crescimento vegetativo (cm²) $\pm$ EP do isolado IBCB 170 de *Beauveria bassiana* em contato com inseticidas registrados para o controle de pragas de solo na cultura da cana de açúcar.

Produto	Dose mínima	Dose média	Dose máxima	F _(gl)	P
Testemunha	9,14 $\pm$ 2,62 Aa	9,14 $\pm$ 2,62 ABa	9,14 $\pm$ 2,62 Aa	0,00 _(2,27)	> 0,05
Actara®	1,40 $\pm$ 0,15 BCb	3,40 $\pm$ 0,88 Da	3,93 $\pm$ 0,30 ABa	5,97 _(2,27)	0,0071
Engeo Pleno®	3,11 $\pm$ 0,34 BCa	0,00 $\pm$ 0,00 Db	0,00 $\pm$ 0,00 Db	81,43 _(2,27)	0,0001
Singular®	3,16 $\pm$ 0,49 BCa	7,04 $\pm$ 2,34 ACBa	7,19 $\pm$ 0,45 ABa	2,63 _(2,27)	0,0906
Diamante®	3,77 $\pm$ 0,72 BCb	11,19 $\pm$ 1,82 Aa	9,00 $\pm$ 0,64 Aa	10,2 _(2,27)	0,0005
Altacor®	3,14 $\pm$ 0,52 BCa	2,52 $\pm$ 0,66 CDa	1,86 $\pm$ 0,35 CDa	1,45 _(2,27)	0,2523
Imidacloprid Nortox®	2,48 $\pm$ 0,30 BCab	3,61 $\pm$ 0,31 BCda	2,15 $\pm$ 0,54 CDb	3,63 _(2,27)	0,0401
Regente® 800	3,16 $\pm$ 1,02 BCab	3,80 $\pm$ 0,99 BCda	0,69 $\pm$ 0,27 CDb	3,83 _(2,27)	0,0342
Talisman®	1,21 $\pm$ 0,15 Ca	0,33 $\pm$ 0,20 Db	0,00 $\pm$ 0,00 Db	17,49 _(2,27)	0,0001
Capture®	0,74 $\pm$ 0,23 Ca	0,00 $\pm$ 0,00 Db	0,00 $\pm$ 0,00 Db	10,22 _(2,27)	0,0005
Marshal® Star	0,11 $\pm$ 0,03 Ca	0,00 $\pm$ 0,00 Db	0,00 $\pm$ 0,00 Db	10,44 _(2,27)	0,0004
Evidence® 700	0,00 $\pm$ 0,00 Ca	0,00 $\pm$ 0,00 Da	0,00 $\pm$ 0,00 Da	0,00 _(2,27)	> 0,05
F _(gl)	8,21 _(12,117)	9,71 _(12,117)	19,13 _(12,117)		
P	0,0001	0,0001	0,0001		

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para o parâmetro germinação, todos os produtos apresentaram diferenças significativas entre as doses utilizadas. O inseticida Marshal Star® não permitiu a germinação do fungo após 24 horas da inoculação em nenhuma das doses testadas. Dessa forma, observou-se que a dose mínima de cada produto foi melhor, comparada as outras. Este fato ocorreu porque havia uma concentração menor dos ingredientes ativos no substrato (meio) no qual os fungos se desenvolveram (Tabela 2).

Quando comparada a germinação de cada produto em uma mesma dose, os inseticidas Diamante® (93,9%), Imidacloprid Nortox® (78%) e Regente®800 (96,7%) não diferiram significativamente entre si na dose mínima e foram iguais a testemunha. Os inseticidas Actara® (64,4%), Singular® (59,3%) e Altacor® (48,9%) foram semelhantes entre si, assim como Capture® (38,7%) também não diferiu destes, mas foi semelhante aos produtos Engeo Pleno® e Talismã® (22,8 % e 8,8%, respectivamente). Na dose média, os inseticidas Engeo Pleno® e Imidacloprid Nortox® não permitiram a germinação de conídios de *B. bassiana*. Todos os demais inseticidas apresentam diferenças significativas em relação à testemunha. Na dose máxima somente os inseticidas Actara® e Regente® 800 (2,9 e 10,8, respectivamente) permitiram a germinação do fungo após 24 horas.

A metodologia utilizada para a determinação da viabilidade de conídios determina que seja avaliado após 24 horas o contato do fungo com o inseticida. Quando observado os dados de germinação verificou-se que em alguns produtos não houve germinação de conídios; no entanto, houve desenvolvimento de colônia e consequentemente esporulação destes conídios. Este fato pode estar relacionado ao processo de adaptação do fungo com o substrato (meio + inseticida). Além disso, o fungo iniciou o processo de germinação em alguns casos, porém não houve formação de colônia e esporulação devido a presença do inseticida.

O processo de germinação de conídios é um fator que apresenta maior importância que o crescimento vegetativo e a esporulação do fungo, tendo em vista que este processo corresponde a primeira etapa no desencadeamento de uma epizootia. Os responsáveis pela reprodução e disseminação do fungo em condições de campo são os conídios, ou seja, o fungo depende deste processo

para infectar o hospedeiro (Khalil et al., 1985; Neves et al., 2001; Alizadeh et al., 2007). Tendo em vista este fato, quando um inseticida provoca diminuição significativa na germinação de esporos, a eficácia deste entomopatógeno em seu alvo pode ser diminuída.

Quando observado os dados de crescimento vegetativo do fungo, verificou-se uma diferença significativa entre os produtos com o ingrediente ativo imidacloprid. Enquanto para Diamante BR® e Imidacloprid Nortox® apresentaram CV para todas as doses testadas, sendo observado os melhores resultados em Diamante BR®. O produto Evidence®700 não favoreceu o desenvolvimento do fungo em nenhum dos parâmetros avaliados. Esta inibição de crescimento pode estar relacionada a concentração do ingrediente ativo na formulação dos produtos. Enquanto Diamante BR® e Imidacloprid Nortox® apresentam concentração igual (480 g/L i.a.), Evidence®700 apresenta concentração maior (700 g/kg i.a.). Outro fator que pode ter influenciado o desenvolvimento do fungo junto a estes produtos, pode estar relacionado ao tipo de formulação dos inseticidas. Diamante BR® e Imidacloprid Nortox® apresentam formulação do tipo suspensão concentrada (SC) e Evidence®700 apresenta formulação grânulo dispersível em água (WG). O mesmo pode ser observado para os inseticidas Singular BR® e Regente® 800, os quais possuem Fipronil como ingrediente ativo, sendo a concentração (Singular® 600 g/L i.a, Regente® 800 g/L i.a) diferenciada também no tipo de formulação. Inseticidas contendo imidacloprid como ingrediente ativo não afetam o CV de *B. bassiana* (Pinto, 2016; Malik et al., 2016; Fiedler e Sosnowska, 2017), mas este estudo mostrou o contrário, visto que os resultados obtidos para o inseticida Evidence®700 mostraram que uso da maior concentração do Ingrediente ativo neste produto levou a inibição do crescimento e desenvolvimento do fungo. Entretanto, o inseticida Evidence®700 pode apresentar compatibilidade com outras espécies de fungos entopatogenicos, como ocorre com *Metarhizium rileyi* (Farlow) Kepler S.A. Rehner e Humber (Ascomycetes: Hypocreales), (Costa et al., 2018).

Inseticidas a base de Bifentrina e Carbosulfano, bem como a mistura de ambos, apresentam um efeito negativo no crescimento vegetativo de *B. bassiana*

para todas as doses utilizadas. Os efeitos negativos de inseticidas a base de Piretroide (Capture®) sobre o desenvolvimento desse fungo também foram relatados por outros autores (Oliveira et al., 2016; Pérez-González e Sánchez-Peña, 2017; Meyling et al., 2018).

Os dados de crescimento vegetativo do isolado testado com o inseticida Engeo Pleno® mostraram que o aumento da dose do produto afetou negativamente o desenvolvimento do fungo. Porém, Pinto (2016) não constatou efeitos negativos do produto ao isolado IBCB 276 de *B. bassiana*, o que pode estar associado a uma grande variabilidade genética presente entre os isolados de fungos entomopatogênicos (Ghini e Kimati, 2000). Esta variabilidade genética pode ser utilizada para a seleção de isolados compatíveis inseticidas em programas de MIP.

Quando avaliada a esporulação do fungo em contato com os inseticidas pode-se observar diferença significativa entre as doses (dose mínima. Media e máxima) utilizadas dos inseticidas Engeo Pleno® ($0,58 \times 10^7$; $0,06 \times 10^7$ e $0,03 \times 10^7$, respectivamente), Diamante® ($1,68 \times 10^7$; $0,85 \times 10^7$ e $0,52 \times 10^7$), Regente®800 ($0,48 \times 10^7$; $0,19 \times 10^7$ e $0,09 \times 10^7$), Talisman® ($0,58 \times 10^7$; $0,04 \times 10^7$ e $0,00$), Capture® ($0,37 \times 10^7$; $0,01 \times 10^7$ e $0,00 \times 10^7$) e Marshal Star® ($0,03 \times 10^7$; $0,00$ e $0,00$) (Tabela 4). O número de conídios foi inversamente proporcional à dose utilizada, ou seja, quanto maior a dose menor o número de conídios. Usando-se o inseticida Singular® não se observou diferença significativa entre as doses, no entanto houve uma relação do aumento de conídios com o aumento da dose, ou seja, na medida em que houve aumento da dose, maior a quantidade de conídios. O inseticida Actara® favoreceu o maior número de conídios em sua dose máxima, seguido pela dose mínima e pela dose media comparado aos demais produtos, sem diferença significativa entre as doses testadas. Para os produtos Altacor®, Imidacloprid Nortox® não houve diferença significativa entre as doses (Tabela 4).

Quando observado o parâmetro de esporulação dentro de uma mesma dose pode-se verificar que todos os inseticidas não diferiram significativamente da testemunha. Na dose media o inseticida Marshal® Star não permitiu a esporulação do fungo após sete dias da inoculação e nos produtos Engeo Pleno®, Talisman® e Capture® a esporulação ficou próxima de zero, diferindo-se

significativamente da testemunha. No dobro da dose, os inseticidas Talisman[®], Capture[®] e Marshal Star[®] não permitiram a esporulação do fungo, sem diferença observada entre os inseticidas Engeo Pleno[®], Diamante[®], Altacor[®], Imidacloprid Nortox[®] e Regente[®] 800. Os valores observados para os inseticidas Actara[®], Singular[®] não diferiram significativamente da testemunha (Tabela 4).

Tabela 4. Número de conídios produzidos ($\times 10^7$) $\pm$ EP do isolado IBCB 170 de *Beauveria bassiana* em contato com inseticidas registrados para o controle de pragas de solo na cultura da cana de açúcar.

Produto	Dose mínima	Dose media	Dose máxima	F (gl)	P
Testemunha	1,83 $\pm$ 0,52 Ba	1,83 $\pm$ 0,52 ABa	1,83 $\pm$ 0,52 Aa	0,00 _(2,27)	1,00
Actara [®]	0,84 $\pm$ 0,13 Ba	0,62 $\pm$ 0,19 CDa	1,34 $\pm$ 0,46 ABCa	1,56 _(2,27)	0,2286
Engeo Pleno [®]	0,58 $\pm$ 0,11 Ba	0,06 $\pm$ 0,03 Db	0,03 $\pm$ 0,01 Db	20,22 _(2,27)	0,0001
Singular [®]	1,28 $\pm$ 0,19 Ba	1,37 $\pm$ 0,29 BCa	1,53 $\pm$ 0,50 ABa	0,13 _(2,27)	0,8761
Diamante [®]	1,68 $\pm$ 0,47Ba	0,85 $\pm$ 0,20 BCDab	0,52 $\pm$ 0,16 BCDb	3,68 _(2,27)	0,0387
Altacor [®]	0,39 $\pm$ 0,26 Ba	0,51 $\pm$ 0,14CDa	0,15 $\pm$ 0,02 CDa	1,08 _(2,27)	0,3549
Imidacloprid Nortox [®]	0,10 $\pm$ 0,01 Ba	0,13 $\pm$ 0,02 Da	0,11 $\pm$ 0,01 CDa	1,2 _(2,27)	0,3178
Regente [®] 800	0,48 $\pm$ 0,13 Ba	0,19 $\pm$ 0,06 Dab	0,09 $\pm$ 0,04 Db	5,58 _(2,27)	0,0094
Talisman [®]	0,58 $\pm$ 0,13 Ba	0,04 $\pm$ 0,01 Db	0,00 $\pm$ 0,00 Db	16,73 _(2,27)	0,0001
Capture [®]	0,37 $\pm$ 0,06 Ba	0,01 $\pm$ 0,01 Db	0,00 $\pm$ 0,00 Db	26,96 _(2,27)	0,0001
Marshal [®] Star	0,03 $\pm$ 0,01 Ba	0,00 $\pm$ 0,00 Db	0,00 $\pm$ 0,00 Db	6,85 _(2,27)	0,0039
Evidence [®] 700	0,00 $\pm$ 0,00 Ba	0,00 $\pm$ 0,00 Da	0,00 $\pm$ 0,00 Da	0,00 _(2,27)	1,00
F (gl)	28,15 _(12,117)	13,61 _(12,117)	7,74 _(12,117)		
P	0,0001	0,0001	0,0001		

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

O aumento da dose dos inseticidas geralmente reduziu o número de conídios. Este comportamento do isolado de *B. bassiana* pode estar relacionado ao processo de metabolização dos princípios tóxicos do ingrediente ativo, num mecanismo de resistência fisiológica, onde pode haver a liberação, no substrato (meio), de moléculas que podem utilizar estes como nutrientes secundários, promovendo seu crescimento vegetativo e esporulação. Outro fator que pode estar relacionado a este tipo comportamento é de que o fungo, numa atividade comparável ao que ocorre com seres vivos em geral, utiliza todo seu esforço reprodutivo na presença de um princípio tóxico que altere seu ambiente,

prejudicando o seu desenvolvimento. Isto resulta em maiores níveis de crescimento vegetativo e esporulação (Moino Júnior e Alves, 1998).

Os inseticidas Diamante[®], Imidacloprid Nortox[®] e Evidence700[®] causaram ao fungo diminuição do número de conídios em relação à testemunha; contudo, Pinto (2016), testando produtos com o mesmo ingrediente ativo, observou diferentes resultados. Enquanto o Winner[®] 200 SL estimulou a esporulação do isolado IBCB 276, o Provado[®] 200 SC reduziu a esporulação.

O crescimento vegetativo e a esporulação apresentam grande importância no processo de infecções secundárias causadas por fungos e, portanto, estes devem ser levados em consideração para a virulência do fungo e persistência no meio ambiente (Schumacher e Poehling, 2012). A conservação de entomopatógenos no ambiente agrícola está relacionada diretamente a estes processos.

De acordo com classificação proposta por Rossi-Zalaf et al. (2008) o produto Singular[®] foi moderadamente tóxico ao isolado IBCB 170 de *B. bassiana* em sua dose mínima recomendada, enquanto os demais inseticidas apresentaram-se tóxicos. Para a dose média recomendada, os produtos Singular[®] e Diamante[®] foram compatíveis com o isolado, sendo os demais inseticidas considerados tóxicos. Para a dose máxima recomendada, somente o inseticida Singular[®] foi compatível. Os inseticidas Actara[®] e Diamante[®] foram moderadamente tóxicos ao isolado testado (Tabela 5).

Testes *in vitro* com o intuito de avaliar a compatibilidade de entomopatógenos com inseticida são vantajosos, pois neste método o patógeno é exposto a todos os efeitos tóxicos do produto, fornecendo-se informações sobre a toxicidade de uma formulação sobre o isolado em estudo, uma vez que eliminam-se alguns eventos que ocorrem em situações de campo (Rossi-Zalaf et al., 2008). Contudo, a compatibilidade de vários produtos fitossanitários com *B. bassiana* foi determinada com a finalidade de verificar quais destes apresentam incompatibilidade de uso para o controle de pragas de solo na cultura da cana-de-açúcar. Este estudo nos permite fornecer informações que podem ser utilizadas para aplicações associadas de entomopatógenos e

inseticidas, promovendo o aumento na suscetibilidade do inseto-alvo, por algumas substâncias sintéticas causarem efeito estressantes, facilitando a infecção e a rápida proliferação da doença causada pelo patógeno.

Tabela 5. Índice Biológico e classificação de compatibilidade entre o isolado IBCB 170 de *Beauveria bassiana* em contato com inseticidas registrados para o controle de pragas de solo na cultura da cana de açúcar.

Produto	Dose Mínima		Dose Média		Dose Máxima	
	IB*	CL	IB	CL	IB	CL
Actara®	33,35	T	35,00	T	53,22	MT
Engeo Pleno®	31,75	T	1,37	T	0,70	T
Singular®	52,29	MT	70,81	C	73,21	C
Diamante®	68,29	T	73,53	C	55,77	MT
Altacor®	31,14	T	26,86	T	12,67	T
Imidacloprid Nortox®	22,87	T	21,64	T	12,84	T
Regente® 800	37,24	T	27,17	T	6,65	T
Talisman®	2,73	T	2,98	T	0,00	T
Capture®	16,39	T	2,45	T	0,00	T
Marshal® Star	1,15	T	0,00	T	0,00	T
Evidence® 700	0	T	0,00	T	0,00	T

*IB = Índice Biológico;

CL = Classificação toxicológica: Tóxicos 0 – 41 (T); Moderadamente Tóxico 42 – 66 (MT) e Compatível > 66 (C).

A falta de padronização dos métodos utilizados para a avaliação destes efeitos em entomopatógenos dificulta a comparação dos resultados de um mesmo produto. As conclusões obtidas em diversos trabalhos apresentam grande divergência entre elas, por terem resultados que variam consideravelmente e que dependem de fatores como o isolado e espécie do fungo, bem como de sua combinação com diferentes produtos, das concentrações dos ingredientes ativos e da formulação de cada produto testado. Diante disso, cada isolado ou espécie de fungo e cada produto fitossanitário podem demonstrar resultados de compatibilidade ou incompatibilidade

específicos para cada caso em particular (Castiglioni et al., 2003; Klingen e Haukeland, 2006). Estes fatores se ligam a grande variabilidade genética presente entre o isolado de uma mesma espécie de fungo entomopatogênico utilizados no controle de pragas (Ghini; Kimati, 2000).

4. CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados adquiridos neste trabalho pode-se concluir que os inseticidas Singular® e Diamante® podem ser associados ao isolado IBCB 170 de *B. bassiana* no manejo de pragas na cultura da cana-de-açúcar.

5. REFERÊNCIAS

- Alizadeh A, Samih MA, Khezri M, Riseh RS (2007) Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with several pesticides. **International Journal of Agriculture and Biology** 9:31-34.
- Alves SB, Haddad ML, Faion M, Baptista, GC, Rossi-Zalaf, LS (2007). Novo índice biológico para classificação de agrotóxicos para fungos entomopatogênicos. **Resumos, 10th Simpósio de Controle Biológico. Brasília, Brasil.**
- Alves, SB, Moino Jr A, Almeida, JEM (1998) Produtos fitossanitários e entomopatógenos. **Controle microbiano de insetos** 2: 21.
- Alves SB, Rigitano RLO, Camargo JLG, (1980) Avaliação da influência de alguns herbicidas utilizados em cana-de-açúcar e pastagens sobre o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, 1883. **Ecos** 5: 21-24.
- Anhalt FA, Azevedo JL, Sugayama RL, Specht A, Barros NM (2010). Potential of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Ascomycetes, hypocreales) in the control of *Bonagota salubricola* (Meyrick) (Lepidoptera, Tortricidae) and its compatibility with chemical insecticides. **Brazilian. Journal. Biology** 70: 931-936.
- Archana MR, Ramaswamy K (2012) Interactive effect of entomopathogenic fungi *Paecilomyces fumosoroseus* with few organophosphate and pyrethroid pesticides: An in vitro study. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Science** 2: 10-17.
- Ashraf M, Farooq M, Shakeel M, Din N, Hussain S, Saeed N, Rajput NA (2017) Influence of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, alone and in combination with diatomaceous earth and thiamethoxam on mortality, progeny production, mycosis, and sporulation of the stored grain insect pests **Environmental Science and Pollution Research**. 24:28165-28174.
- Bitsadze N, Jaronski S, Khasdan V, Abashidze E, Abashidze M, Latchininsky A, Horowitz AR. (2013) Joint action of *Beauveria bassiana* and the insect growth regulators diflubenzuron and novaluron, on the migratory locust, *Locusta migratoria*. **Journal of Pest Science** 86: 293-300.
- Botelho AAA, Monteiro AC (2011) Sensibilidade de fungos entomopatogênicos a agroquímicos usados no manejo da cana-de- açúcar. **Bragantina** 361-369.
- Castellanos González L, Nicao L, María E, Muiño, BL (2013). Compatibilidad de cuatro plaguicidas de diferentes grupos químicos con *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & Gams. **Revista de Proteção Vegetal** 28: 199-203.

Castiglioni E, Vendramim JD, Alves SB (2003). Compatibilidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* con Nimkol-L® para el combate de *Heterotermes tenuis*. **Manejo integrado de plagas y agroecologia**, 69:38-44.

Cintra ERR, Loureiro ES, Almeida JEM, Gassen MH, Batista Filho A, Wenzel I M, Hojo H (2013). Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* à cigarra do café *Fidicinoides pronoe* (Hemiptera: Cicadidae) e sua compatibilidade com agrotóxicos utilizados na cultura do cafeeiro. **Biologia** 75:63-70,

Da Costa MA, Loureiro EDS, Pessoa, LGA, Dias PM (2018) Compatibilidade de inseticidas utilizados na cultura do eucalipto com *Metarhizium rileyi* (Farlow) (= *Nomuraea rileyi*). **Journal of Agricultural Science** 5:44-48.

Da Silva Santos Á B, da Silva TFB, Paiva LM, Santos AC, Alves-Lima, EADL. (2009). Efeito fungitóxico do óleo de nim sobre *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Revista Caatinga** 22.

Da Silva ID, de Sousa Nunes GH, Lima EÁDLA, Alves ND, Feijó FMC (2006) Avaliação do fungo *Beauveria bassiana*, associado a mosquicida com método de controle biológico de dípteros de interesse médico veterinário sob condições de laboratório. **APRESENTAÇÃO ORAL**, 166.

Depieri RA, Martinez SS, Menezes Jr AO (2005) Compatibility of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) with extracts of neem seeds and leaves and the emulsible oil. **Neotropical Entomology.**, 34: 601-606.

Dinardo-Miranda LL (2014) *Sphenophorus levis*. In: Dinardo-Miranda LL *Nematoides e pragas da cana-de-açúcar*. Campinas: **Instituto Agronômico**. 7: 210-262.

Duarte RT, Gonçalves KC, Espinosa DJL, Moreira LF, De Bortoli SA. Humber, RA, Polanczyk RA (2016) Potential of entomopathogenic fungi as biological control agents of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) and compatibility with chemical insecticides. **Journal of Economic Entomolog.** 109: 594-601.

Fiedler Ž, Sosnowska D (2017) Side effects of fungicides and insecticides on entomopathogenic fungi in vitro. **Journal of Plant Protection Research**, 57: 4.

Gassen MH, Batista Filho A, Zappelini LO, Wenzel IM (2008) Efeito de agrotóxicos utilizados na cultura da goiaba sobre o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivo Instituto Biológico** 75: 327-342.

Ghini R, Kimati H (2000). *Resistência de fungos a fungicidas*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 78

Grijalba Bernal EP, Gómez Álvarez MI, Zuluaga MV (2014) Compatibilidad in vitro de *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown y Smith (Hypocreales: Clavicipitaceae) con plaguicidas comerciales. **Acta Agronomica**, 63:1

Halder J, Kushwaha D, Rai AB, Singh A, Singh, B. (2017) Potential of entomopathogens and neem oil against two emerging insect pests of vegetables. **Indian Journal of Agricultural Science** 87: 220-224.

Hall IM, Dunn PH (1959). The effect of certain insecticides and fungicides on fungi pathogenic to the spotted alfalfa aphid. **Journal of Economic Entomology**, 52: 28-29.

Hernandez MM, Martinez-Villar E, Peace C, Perez-Moreno I, Marco V (2012) Compatibility of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* with flufenoxuron and azadirachtin against *Tetranychus urticae*. **Experimental and Applied Acarology** 58: 395–405.

Hernández-Martínez P, Hernández-Rodríguez CS, Krishnan V, Crickmore N, Escriche B, Ferré J (2012) Lack of Cry1Fa binding to the midgut brush border membrane in a resistant colony of *Plutella xylostella* moths with a mutation in the ABCC2 locus. **Applied and Environmental Microbiology**. 78: 6759-6761.

Hill. Dennis S. (1983). *Agricultural insect pests of the tropics and their control*. Cambridge University Press.

Hiromori H, Nishigaki J. (2001) Factor analysis of synergistic effect between the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and synthetic insecticides. **Applied Entomology Zoology** 36: 231-236.

Ignoffo CM, Hostetter DL, Garcia C, Pinnell RE (1975) Sensitivity of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* to chemical pesticides used on soybeans. **Environmental Entomology** 4: 765-768.

Islam MT, Castle SJ, Ren S (2010) Compatibility of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* with neem against sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*, on eggplant. **Entomologia Experimentalis Applicata**, 134: 28-34.

Islam MT, Omar D, Latif MA, Morshed MM (2011). The integrated use of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* with botanical insecticide, neem against *Bemisia tabaci* on eggplant. **African Journal of Microbiology Research**, 5: 3409-3413.

Jaques RP, Patterson NA (1962) Control of the apple sucker, *Psylla mali* Schmidb., by the fungus *Entomophthora sphaerosperma* (Fresenius). **The Canadian Entomologist**, 94: 818-825.

Jaramillo J, Borgemeister C, Ebssa L, Gaigl A, Tobón R, Zimmermann G. (2005) Effect of combined applications of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain CIAT 224 and different dosages of imidacloprid on the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae). **Biological Control**, 34: 12-20.

Khalil SK, Shah MA, Naeem M (1985) Laboratory studies on the compatibility of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* with certain pesticides. **Agriculture Ecosystems Environment**, 13: 329-334.

Klingen I, Haukeland S (2006) The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. In *An ecological and societal approach to biological control* (pp. 145-211). **Springer, Dordrecht**.

Malik MA, Manzoor M, Ali H, Muhammad A, Ul Islam S, Qasim M, Saqib HSA (2016). Evaluation of imidacloprid and entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Entomology and Zoology Studies**, 4: 262-268.

Marques RP, Monteiro AC, Pereira GT 2004. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações de óleo de Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural** 34: 1675-1680.

Meyling NV, Arthur S, Pedersen KE, Dhakal S, Cedergreen N, Fredensborg BL (2018). Implications of sequence and timing of exposure for synergy between the pyrethroid insecticide alpha-cypermethrin and the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Pest management science** 74: 2488-2495.

Moino Jr AM, Alves SB (1998) Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis*. **Sociedade Entomologica Brasileira**, 27: 611-619.

Neves PM, Hirose E, Tchujo PT, Moino Jr A. (2001) Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. **Neotropical Entomology**, 30: 263-268.

Niassy S, Maniania NK, Subramanian S, Gitonga ML, Maranga R, Obonyo AB, Ekesi S (2012) Compatibility of *Metarhizium anisopliae* isolate ICIPE 69 with agrochemicals used in French bean production. **International journal of pest management**, 58: 131-137.

Oliveira DGP, Cardoso RR, Mamprim AP, Angeli LF (2016) Laboratory and Field Evaluation of a Cypermethrin-Based Insecticide for the Control of *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae) and Its In-Vitro Effects on

Beauveria bassiana Bals. Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae). **Brazilian Journal of Poultry Science**, 18: 371-380.

Pelizza SA, Scorsetti AC, Fogel MN, Pacheco-Marino SG, Stenglein SA, Cabello MN, Lange CE (2015) Compatibility between entomopathogenic fungi and biorational insecticides in toxicity against *Ronderosia bergi* under laboratory conditions. **Bio Control** 60: 81–91.

Pérez-González O, Sánchez-Peña SR (2017) Compatibility in Vitro and in Vivo of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* 1 and *Hirsutella citriformis* 2 with Selected Insecticides. **Southwestern Entomologist**, 42: 707-719.

Pinto APF (2016) **Patogenicidade de fungos entomopatogênicos e compatibilidade com inseticidas para o manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama, (Hemiptera: Liviidae)**. 91f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu - SP

Pinto APF, Batista Filho A, De Almeida JEM, Wenzel IM (2013) Patogenicidade de *Beauveria bassiana* ao psíldeo *Diaphorina citri* e compatibilidade do fungo com produtos fitossanitários. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 47: 1673-1680.

Pinto AS, Botelho PSM, De Oliveira HN (2009). **Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos da cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP2 p. 108

Pires LM, Marques EJ, Oliveira JV, Alves SB (2010) Seleção de Isolados de Fungos Entomopatogênicos para o controle de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) e sua compatibilidade com alguns inseticidas usados na cultura do tomateiro. **Biological Control** 39:977-984.

Precetti AACM, Arrigoni EB (1990) Aspectos biológicos e controle do besouro *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar. **Boletim Técnico Coopersucar** – Edição Especial. 15p

Rashid M, Baghdadi A, Sheikhi A, Pourian HR, Gazavi M. (2010) Compatibility of *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) with several insecticides. **Journal of Plant Protection Research** 50: 22–27.

Ribeiro LP, Blume E, Bogorni PC, Dequech STB, Brand SC, Junges E (2012). Compatibility of *Beauveria bassiana* commercial isolate with botanical insecticides utilized in organic crops in southern Brazil. **Biological agriculture & horticulture**, 28: 223-240.

Rocha RB, Melo EASF, Santos OO, Bittencourt MAL (2012). Compatibilidade e efeito de produtos comerciais à base de nim e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre *Metamasius hemipterus* L. (Coleoptera: Curculionidae). **Magistra**, 24: 39-51.

Rossi-Zalaf L S, Alves SB, Lopes RB, Silveira Neto S, Tanzini MR (2008) Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças. **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**, 270-302.

Safavi SA, Shah FA, Pakdel AK, Reza Rasoulia G, Bandani AR, Butt TM (2007) Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **FEMS Microbiology Letters**, 270: 116-123.

Santos A, Grijalba E, Zuluaga MV, Gómez M, Villamizar L (2013) Compatibilidad in vitro de un bioplaguicida a base de *Lecanicillium lecanii* (Hypocreales: Clavicipitaceae) con agroquímicos empleados en los cultivos de algodón y berenjena. **Revista Colombiana de Biotecnología**, 15: 132-142.

Schumacher V, Poehling H (2012) In vitro effect of pesticides on the germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. **Fungal Biology**. 116: 121-132.

Shakir HU, Saeed M, Anjum N, Farid A, Khan IA, Liaquat M, Badshah T. (2015) Combined effect of entomopathogenic fungus (*Beauveria bassiana*), imidacloprid and potassium silicate against *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae) in rice crop. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, 3: 173-77.

Shapiro-Ilan DI, Cottrell TE, Wood BW (2011) Effects of Combining Microbial and Chemical Insecticides on Mortality of the Pecan Weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, 104: 14 – 20.

Shewale CP, Mohite PB (2018) Combined Efficacy of Entomopathogenes and Insecticides Against White Grub, *Leucopholis lepidophora* (Blanchard) Infesting Sugarcane. **Jornal of Entomology and Zoology Studies**, 6: 1824-1827.

Silva RAD, Quintela ED, Mascarin GM, Barrigossi JAF, Lião LM (2013) Compatibility of conventional agrochemicals used in rice crops with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Scientia Agricola**, 70: 152-160.

Simi LD (2014) **Controle de *Sphenophorus levis* e *Conotrachelus humeropictus* pelo uso combinado de nematoides e fungos entomopatogênicos**. 107 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu,

Tanzini MR, Alves SB, Setten A (2002) Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados no controle de *Leptopharsa heveae* para fungos entomopatogênicos. **Arquivos do Instituto Biológicos**, 69: 65-69.

Tkaczuk C, Harasimiuk M, Król A, Bereś PK (2015) The effect of selected pesticides on the growth of entomopathogenic fungi *Hirsutella nodulosa* and *Beauveria bassiana*. **Journal of Ecological Engineering** 16: 177–183.

Tkaczuk C, Krzyczkowski T, Głuszcak B, Król A (2012) Wpływ wybranych środków ochrony roślin na wzrost kolonii i kiełkowanie zarodników owadobójczego grzyba *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. [The influence of selected pesticides on the colony growth and conidial germination of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Progress in Plant Protection** 52: 969–974.

Vega FE, Jackson MA, Mercadier G, Poprawski TJ (2003) The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. **World journal of Microbiology and Biotechnology**. 19: 363-368.

Wenzel LM, Batista Filho A, Gassen MH, Almeida AD (2008) Compatibilidade de *Lecanicillium lecanii* (Hyphomycetes), em condições de laboratório e estufa, aos agrotóxicos utilizados na cultura do crisântemo. **Arquivo Instituto Biológico**, 75: 157-166.

Yii JE, Bong CFJ, King JHP, Kadir J. (2015) Synergism of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* incorporated with fipronil against oil palm pest subterranean termite, *Coptotermes curvignathus*. **Plant Protection Science**, 52: 35-44.