

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE *BEAUVERIA BASSIANA* COLETADOS DE
SOLOS E INSETOS VISANDO AO CONTROLE DE *SPHENOPHORUS LEVIS*
VAURIE, 1978 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

GUSTAVO ANDRADE CARNEIRO

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk

**Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, para graduação em ENGENHARIA
AGRONÔMICA**

Jaboticabal – SP

2024

C289b Carneiro, Gustavo Andrade
Bioprospecção de isolados de *Beauveria bassiana*
/ Gustavo Andrade Carneiro. -- Jaboticabal, 2025
62 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado -
Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Ricardo Antonio Polanczyk

1. Entomologia Agrícola. 2. Controle Biológico. 3.
Cana-de-açúcar. I. Título.

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus Jaboticabal



GUSTAVO ANDRADE CARNEIRO

**BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE *Beauveria bassiana* COLETADOS DE SOLOS
E INSETOS VISANDO AO CONTROLE DE *Sphenophorus levis* (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Agronômica.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk

Área de Concentração: Fitossanidade

Data da defesa: 14/11/2024

(X) Aprovado

() Reprovado

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br RICARDO ANTONIO POLANCZYK
Data: 25/11/2024 10:54:04-8300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk

UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
gov.br DANIEL JÚNIOR DE ANDRADE
Data: 23/11/2024 10:45:35-8300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Daniel Júnior de Andrade

UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
gov.br LANA LETICIA BARBOSA DE CARVALHO
Data: 22/11/2024 06:57:39-0390
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Lana Leticia Barbosa de Carvalho

UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: _____ / _____ / _____

Documento assinado digitalmente
gov.br DANIEL JÚNIOR DE ANDRADE
Data: 23/11/2024 10:46:50-8300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Daniel Júnior de Andrade
Chefe do Departamento

“O homem que não atravessa o inferno
de suas paixões também não as supera.”
(Carl G. Jung)

DEDICO

A Deus pela força e sabedoria concedidas
ao longo dessa jornada, e a minha família,
pelo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, saúde, amor e caminhos que me foram dados ao longo dessa jornada. Sem a presença e orientação Dele e de outros que estiveram comigo, seria impossível alcançar cada uma das conquistas até aqui. A fé foi o que me guiou nos momentos de maior dificuldade.

À minha mãe, Márcia Cristina Andrade Carneiro, e ao meu pai, Murilo Carneiro, que sempre acreditaram no meu potencial, me apoiaram em minhas decisões e me proporcionaram inúmeras oportunidades para estar aqui.

À minha Iyalorixá, Leda Maria Pereira dos Santos (in memoriam), que me acolheu em sua casa no momento mais difícil de minha vida, proporcionando o apoio necessário para me reerguer e encontrar minha fé.

À Letícia Pedroso Penedo, que sempre esteve ao meu lado, ouvindo todas minhas angústias e sempre me aconselhando. Sua parceria e apoio me ajudaram a superar momentos muito difíceis. Sou muito grato por fazer parte da minha vida.

Aos amigos da faculdade, especialmente do Vegas: Enzo Palocci (Nenas), Isaac Petersen (Slender), Alexandre Barros (Xandão), Mário Martins (Cacto), Pedro Parreira (Boleta) e Pablo Lima, e do Curral: Alessandra Andrade, Raphaela Cezar (FBI) e Karine de Deus (Breque), que se tornaram minha família. Vocês estiveram comigo nos piores momentos e nas maiores alegrias dessa jornada. Cada conversa, risada e apoio que compartilhamos me ajudou a seguir em frente, mesmo nos dias mais desafiadores. Não há palavras para descrever o carinho que sinto por vocês.

Aos colegas, parentes e amigos, Caique Aguiar, Lana Carvalho, Sandra Andrade, Murilo Carneiro, Edimar Peterlini, Fabiana Machado, Joacir do Nascimento, Lucas Rotiroti, Prof. Dra. Mara Cristina da Cruz, Nicholas Uehara, Dagmara Ramalho, Félix Neto, Pablo Lima e Isaac Petersen, que se dedicaram a coletar amostras de

solo e insetos do campo para que esse trabalho pudesse ser realizado. Sem a ajuda de vocês nada disso seria possível. Agradeço muito pela dedicação e disposição.

À Lana Letícia Barbosa de Carvalho, que me ensinou cada passo ao longo desse caminho, sempre chamando minha atenção e cobrando muito de mim, mas com uma preocupação verdadeira em me ver crescer. Sua exigência e orientação me ajudaram a evoluir e superar obstáculos. Sou profundamente grato por tudo o que fez por mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk, que depositou sua confiança em mim dando a oportunidade de realizar esse trabalho de suma importância. Sou muito grato pela orientação e apoio durante todo esse processo.

À Dra. Andressa de Souza Pollo pela realização das análises moleculares e compartilhamento dos seus conhecimentos em microbiologia, contribuindo de forma essencial para esta pesquisa.

À Unesp/FCAV, que me proporcionou o ambiente necessário para aprender, crescer e desenvolver, tanto de forma profissional quanto pessoal. Tenho muito orgulho de fazer parte desta instituição, a qual honrarei sempre.

Ao LCMAP, laboratório onde tive a oportunidade de trabalhar, evoluir e conhecer pesquisadores incríveis. Agradeço aos amigos, Paulo Martins, Lana Carvalho, Alessandra Andrade e Linda Pacherres. Vocês fizeram o ambiente de trabalho de se tornar leve e agradável. Cada conversa, auxílio, risadas e ensinamentos compartilhados me impulsionaram a ser uma pessoa melhor e a seguir firme no meu caminho. Possuo uma grande admiração por cada um de vocês. Sou muito feliz pela nossa amizade e por ter tido a oportunidade de trabalhar com vocês.

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	13
2. ABSTRACT	14
3. INTRODUÇÃO	15
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
4.1 Cana-de-açúcar	18
4.2 <i>Sphenophorus levis</i>	19
4.3 Controle de <i>Sphenophorus levis</i>	21
4.4 <i>Beauveria bassiana</i>	24
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
5.1 Local	26
5.2 Amostragem de solo.....	26
5.3 Isolamento de fungos entomopatogênicos	27
5.3.1 Meio de cultura seletivo	27
5.3.2 Método <i>Insect bait</i>	30
5.3.3 Insetos mortos em campo	32
5.4 Identificação de gênero	32
5.5 Armazenamento e preservação dos isolados fúngicos	33
5.5.1 Criopreservação de isolados fúngicos a -80°C	33
5.5.2 Armazenamento em óleo mineral	35
5.6 Coleta de <i>Sphenophorus levis</i>	36
5.7 Bioensaio.....	37
5.8 Análise molecular de <i>Beauveria</i> spp.	41
6. RESULTADOS.....	44
7. DISCUSSÃO	50

8. CONCLUSÕES	54
9. LITERATURA CITADA	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Crescimento de fungos presentes no solo em placa de Petri com meio de cultura.	29
Figura 2 - Repicagem em 3 pontos para obtenção de colônia fúngica pura.....	29
Figura 3 - Repicagem em placa cheia da colônia fúngica purificada.....	30
Figura 4 - <i>Tenebrio molitor</i> colonizado por fungo entomopatogênico.....	31
Figura 5 - Cortes na colônia fúngica para visualização em microscópio.	33
Figura 6 - Corte dos discos circulares de colônia fúngica para o armazenamento do isolado em ultrafreezer a -80°C.....	34
Figura 7 - Criotubos contendo discos fúngicos armazenados em ultrafreezer a -80 °C.....	35
Figura 8 - Tubos de vidro com crescimento fúngico armazenado em óleo mineral.	36
Figura 9 - Iscas de cana-de-açúcar para coleta de <i>Sphenophorus levis</i>	37
Figura 10 - Imersão de <i>Sphenophorus levis</i> em solução fúngica.	40
Figura 11 - Potes plásticos contendo <i>Sphenophorus levis</i> após o bioensaio com isolados fúngicos do gênero <i>Beauveria</i>	41
Figura 12 - Crescimento de isolados fúngicos após incubação.....	43
Figura 13 – Análise microscópica de conidióforos, conídios e hifas dos isolados prospectados.....	45
Figura 14 - Isolados do gênero <i>Beauveria</i> , LCMAP 002 (A), LCMAP 018 (B), LCMAP 060 (C), LCMAP 065 (D), LCMAP 070 (E), LCMAP 077 (F), LCMAP 078 (G), LCMAP 079 (H) e LCMAP 106 (I).....	46
Figura 15 – Colonização fúngica do isolado LCMAP 078 em adultos de <i>Sphenophorus levis</i>	47

Figura 16 - Análise bayesiana de sequências ITS rDNA de isolados de <i>Beauveria</i> sp.; Grupo externo. <i>Metarhizium</i> sp.; Números nos internódios: valores de suporte do clado.....	49
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Avaliação da mortalidade de isolados fúngicos prospectados de solos e insetos em adultos de <i>Sphenophorus levis</i>	47
Gráfico 2 – Concentração letal média (CL ₅₀) de adultos de <i>Sphenophorus levis</i> imersos no isolado LCMAP 078 com diferentes concentrações.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Localidade, origem e código dos solos utilizados no projeto de prospecção de fungos entomopatogênicos. 26

Tabela 2 – Teste de mortalidade de isolados fúngicos prospectados a partir de solos e insetos contra adultos de *Sphenophorus levis*. 46

Tabela 3 - Concentração letal média (CL₅₀) de adultos de *Sphenophorus levis* imersos no isolado LCMAP 078 com diferentes concentrações. 48

Tabela 4 – Tempo letal médio (TL₅₀) de adultos de *Sphenophorus levis* imersos no isolado LCMAP 078 com diferentes concentrações 48

1. RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) possui grande importância no cenário econômico mundial, sendo o Brasil o maior produtor, o qual visa sempre trazer melhorias e inovações a esse setor. Contudo, devido a expansão contínua, vários fatores têm afetado a produção de cana-de-açúcar no Brasil, destacando-se, os insetos-praga. Dentre eles, um dos mais prejudiciais nos canaviais do Centro-Sul é o *Sphenophorus levis*. Suas larvas são as principais responsáveis pelos danos, pois constroem galerias que levam à morte da planta e ocasionam falhas na brotação de soqueiras. Para reduzir os prejuízos causados por insetos-pragas é importante a implementação de um programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP). Uma das medidas de controle mais eficazes presente no MIP é o controle biológico de insetos com a utilização de fungos entomopatogênicos. Dentre esses, destaca-se a *Beauveria bassiana*, a qual já foi testada no controle de *S. levis* em cana-de-açúcar e foi observado alta eficácia. Diante disso, esse projeto teve como objetivo a prospecção de *B. bassiana*, com a finalidade de encontrar isolados com alto potencial de controle para *S. levis*. O ensaio foi conduzido no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas (LCMAP) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Unesp/FCAV) em Jaboticabal, SP. O isolamento desses fungos entomopatogênicos foi realizado utilizando o método com meio seletivo, método *Insect bait* e coleta de insetos mortos em campo. Foram utilizados 23 tipos de solos, provenientes de estados das cinco regiões geográficas do Brasil (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul). Cada gênero de fungo encontrado foi transferido para o meio de cultura BDA até obter a colônia pura. O teste de mortalidade foi realizado através da imersão dos insetos em uma suspensão com concentração de 1×10^8 conídios/mL. Cada repetição continha 8 insetos para cada isolado do gênero *Beauveria* identificado. Para a testemunha, os insetos foram imersos em água estéril. Foram realizadas 4 repetições. A avaliação de mortalidade foi realizada por 15 dias consecutivos. Dentre os isolados obtidos, 9 foram identificados sendo do gênero *Beauveria*, em que 4 foram patogênicos aos adultos de *S. levis*. O isolado LCMAP 078 apresentou o melhor resultado com uma mortalidade de 75% em 21 dias. A concentração letal média (CL_{50}) do isolado LCMAP 078 para adultos de *S. levis* foi de $2,67 \cdot 10^7$ conídios/mL e o tempo letal médio (TL_{50}) na concentração $1 \cdot 10^8$ conídios/mL foi de 8,791 dias, na concentração $1 \cdot 10^9$ conídios/mL foi de 6,329 dias e na concentração $1 \cdot 10^{10}$ conídios/mL foi de 5,398. Após a identificação molecular foi constatado que o isolado pertence a espécie *B. bassiana*.

2. ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum officinarum*) holds great importance in the global economic landscape, and its largest producer is Brazil, which continually seeks to bring improvements and innovations to this sector. However, due to ongoing expansion, several factors have impacted sugarcane production in Brazil, including pest insects. Among them, one of the most detailed in the sugarcane fields of the Center-South is *Sphenophorus levis*. Its larvae are primarily responsible for the damage, as they create tunnels that lead to plant death and cause failures in sprouting of ratoons. To reduce the damage caused by pest insects, it is important to implement an Integrated Pest Management (IPM) program. One of the most effective control measures within IPM is the biological control of insects using entomopathogenic fungi. Among these, one of the most important is *Beauveria bassiana*, which has already been tested for controlling *S. levis* in sugarcane, showing high efficacy. The objective of this project was to prospect for *B. bassiana*, with the aim of finding isolates with high potential for controlling *S. levis* and performing molecular identification of these promising isolates. The trial was conducted at the Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas (LCMAP) at the Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Unesp/FCAV) in Jaboticabal, SP. The isolation of these entomopathogenic fungi was performed using the selective medium method, the Insect Bait method, and collection of dead insects in the field. Twenty-three types of soil were used, from states in the five geographic regions of Brazil (North, Northeast, Central-West, Southeast, and South). Each genus of fungus found was transferred to PDA culture medium until a pure colony was obtained. The mortality test was conducted by immersing the insects in a suspension with a concentration of 1×10^8 conidia/mL. Each repetition contained 8 insects for each isolate of the *Beauveria* spp. identified. For the control, the insects were immersed in sterile water. Four repetitions were performed. Mortality evaluation was carried out for 15 consecutive days. Of the isolates obtained, 9 were identified as belonging to the *Beauveria* spp., 4 of which were pathogenic to *S. levis* adults. The LCMAP 078 isolate achieved the best result, showing 75% mortality in 21 days. The lethal concentration median (LC_{50}) of the LCMAP 078 isolate for *S. levis* adults was $2,67.10^7$ conidia/mL, and the lethal time median (LT_{50}) at a concentration of 1.10^8 conidia/mL was 8,791 days, at 1.10^9 conidia/mL it was 6,329 days, and at 1.10^{10} conidia/mL it was 5,398 days. After molecular identification, it was found that the isolate belonged to the species *B. bassiana*.

3. INTRODUÇÃO

O Brasil possui destaque mundial no setor sucroenergético, sendo um mercado em constante expansão, tanto na produção de açúcar quanto na produção de álcool e subprodutos (BARBOSA et al., 2020). Na safra 2023/24, o país produziu 713,2 milhões de toneladas, atingindo um novo recorde (CONAB, 2024). Apesar dessa alta produção e crescimento, vários fatores afetam seu rendimento, com destaque para os insetos-praga, dos quais estima-se que existam aproximadamente 85 espécies causando danos à cultura no Brasil (MACEDO et al., 2010).

Com o decreto da Lei Estadual 11.241 (SÃO PAULO, 2002), que determinou a eliminação gradual do uso do fogo para despalha da cana-de-açúcar nos canaviais paulistas, juntamente com a adoção da técnica de cobertura do solo utilizando a palha remanescente, observou-se um aumento na população de certas pragas, como, por exemplo, a de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) (DINARDO-MIRANDA & FRACASSO, 2013; GABRIEL FILHO et al., 2024). Esse inseto é uma praga de solo, sendo uma das mais prejudiciais à cultura da cana-de-açúcar nos estados do Centro-Sul (VINHA et al., 2020), podendo gerar perdas de 20 a 30 toneladas de cana-de-açúcar por hectare ao ano, resultando em um prejuízo de até 5 mil reais por hectare (GARCIA & BOTELHO, 2016).

Sua fase larval é responsável pelos principais danos à cultura, alimentando-se da parte basal dos colmos, construindo galerias que danificam o interior da planta. Os adultos dessa praga permanecem geralmente no solo, sob os restos vegetais ou entre os perfilhos na base da touceira (DINARDO-MIRANDA, 2000). Os danos causados podem ocasionar amarelecimento de folhas, morte precoce de perfilhos, morte de plantas e falhas na brotação de soqueiras (PRECETTI & ARRIGONI, 1990), podendo

resultar em uma grande diminuição na produtividade e longevidade dos canaviais (DINARDO-MIRANDA et al., 2006).

A principal forma de controle dessa praga é a destruição mecânica da soqueira, promovendo o ressecamento dos rizomas e expondo as larvas aos seus predadores e às altas temperaturas (DINARDO-MIRANDA, 2018). Esse método geralmente é associado com a aplicação de produtos fitossanitários via *drench* ou jato dirigido (DINARDO-MIRANDA, 2018). Porém, muitos indivíduos conseguem sobreviver por conta da técnica de controle não os atingir e assim permanecem no campo alimentando-se de restos culturais (ALMEIDA, 2005).

Dentre os produtos fitossanitários empregados no controle dessa praga, é comum a utilização de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 (Hypocreales: Cordycipitaceae), um fungo entomopatogênico altamente empregado por ser específico, seletivo, compatível com outros métodos e seguro ambientalmente (ALMEIDA et al., 2007; XAVIER et al., 2024). Essa espécie de fungo está amplamente distribuída no mundo e pode ser isolada a partir de insetos e solos (DOMINGUES et al., 2022).

De acordo com a relação dos produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica, registrada pelo MAPA (2024), 86,7% dos produtos que contém *B. bassiana* como um dos ingredientes ativos utilizam a cepa IBCB 66. No entanto, em estudos realizados por Simi (2014) e Almeida et al. (2009), este isolado não demonstrou diferença significativa da testemunha no controle de adultos de *S. levis* e *Cosmopolites sordidus* Germar, 1824 (Coleoptera: Curculionidae).

A diversidade de cepas resulta em características únicas que melhoram a eficácia do controle, uma vez que apresentam resistência aprimorada a condições climáticas adversas, maior especificidade para hospedeiros e diferentes níveis de

virulência (ZHANG et al., 2024). Essas variações podem proporcionar uma vantagem significativa diante dos diferentes cenários agrícolas em nosso país (ALVARES et al., 2013). A bioprospecção tem sido uma das estratégias para a descoberta desses novos genes, podendo ser feita através da coleta de insetos mortos na natureza e amostras de solos (ALVES & FARIA, 2010). Cada isolado identificado pode ser explorado para o desenvolvimento de inovações sustentáveis de base microbiana com potencial para gerar novos produtos (VUONG et al., 2022).

Com base nos danos que *S. levis* ocasiona a cultura da cana-de-açúcar e a importância de novas cepas fúngicas para o controle dessa praga, torna-se necessária a bioprospecção de microrganismos entomopatogênicos, com foco no controle biológico de *S. levis*. Portanto, o objetivo deste trabalho foi isolar diferentes cepas do fungo *B. bassiana* de solos e insetos de diferentes regiões do Brasil, com a finalidade de encontrar isolados com alto potencial no controle de *S. levis*.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é a cultura agrícola mais produzida no mundo com 1,9 bilhão de toneladas por safra (FAO, 2024). O desenvolvimento da cultura ao longo dos séculos se deu graças ao seu papel crucial na economia, desde o período colonial até os dias atuais, destacando-se como uma das principais fontes de energia renovável (FAO, 2020). O cultivo da cana-de-açúcar visa a produção de açúcar e biocombustíveis, como o etanol, consolidando o Brasil como maior produtor e exportador de açúcar e segundo maior produtor de etanol (VIDAL, 2023), mundialmente. Na última safra (2023/24), o Brasil atingiu uma produção recorde de 713,2 milhões de toneladas (CONAB, 2024).

O ciclo produtivo da cana-de-açúcar é caracterizado por uma alta exigência hídrica (AVILEZ et al., 2018) e nutricional (MEENA et al., 2015), demandando condições edafoclimáticas específicas (SILVEIRA et al., 2012). A cultura exige solos férteis e bem drenados com boa distribuição pluviométrica durante o seu ciclo (OLIVEIRA FILHO et al., 2016). Em locais com menos condições favoráveis, o manejo adequado da fertilização e da irrigação pode aumentar significativamente a produtividade e qualidade dos colmos, com destaque para o uso eficiente de fertilizantes nitrogenados, potássicos e fosfatados (FRANCO et al., 2011).

Nos últimos anos, o setor sucroalcooleiro tem avançado na mecanização agrícola e em técnicas de manejo. A colheita mecanizada aumentou significativamente após a proibição do uso de fogo na colheita, devido às dificuldades para a colheita manual. Isso gerou grandes mudanças nos sistemas de cultivo, incluindo impactos na qualidade do solo e na estrutura dos sistemas radiculares (SCOPINHO et al., 1999; TORQUATO, 2013).

No que diz respeito à fitossanidade, a cana-de-açúcar está suscetível a diversos insetos e doenças que afetam sua produtividade. As principais pragas são *Diatraea saccharalis* Fabr., 1794 (Lepidoptera: Pyralidae), *Sphenophorus levis*, *Mahanarva fimbriolata* Stål, 1854 (Hemiptera: Cercopidae), *Migdolus fryanus* Westwood, 1863 (Coleoptera: Vesperidae) e *Telchin licus* Drury, 1773 (Lepidoptera: Castniidae) (DINARDO-MIRANDA, 2018). Essas pragas estão amplamente disseminadas nas lavouras, podendo causar enormes danos às plantas, exigindo estratégias integradas de controle (CTC, 2018).

4.2 *Sphenophorus levis*

S. levis, popularmente conhecido como bicudo-da-cana, pertence à família Curculionidae, sendo nativo das Américas, com seu primeiro relato registrado em 1978. O ciclo de vida desse inseto está diretamente ligado à cana-de-açúcar, onde provoca significativos prejuízos econômicos, sendo considerado a praga de solo mais importante e prejudicial à cultura da cana-de-açúcar no estado de São Paulo. As larvas alimentam-se da parte basal dos colmos, formando galerias, que comprometem o desenvolvimento das plantas e a rebrota (PRECETTI & ARIGONI, 1990).

O ciclo biológico de *S. levis* apresenta dois picos populacionais anuais: o primeiro entre fevereiro e março, e o segundo entre outubro e novembro. Para as larvas, os picos ocorrem de maio a julho e novamente em novembro (PRECETTI & TERÁN, 1983). Os maiores danos ocorrem durante a fase seca do ano, de maio a novembro, especialmente nos três primeiros meses, período em que a planta está mais vulnerável a estresses ambientais (ALMEIDA, 2005).

A oviposição ocorre na parte interna dos colmos, onde a fêmea usa o rostro para abrir um orifício e depositar os ovos individualmente (CASTELIANI et al., 2020). O período de incubação dos ovos varia de 7 a 12 dias (PINTO, 2009), enquanto o estágio pupal dura de 5 a 13 dias. Os adultos de *S. levis* têm coloração castanho-escura com manchas pretas no tórax e listras longitudinais nos élitros. Os machos são geralmente menores que as fêmeas. Apesar de possuírem asas, não foi observado voo nem capturas em armadilhas luminosas próximas aos locais de infestação. Esse inseto apresenta baixa dispersão, deslocando-se, em média, 9,60 metros por mês. Em campo, as fêmeas tendem a se deslocar mais que os machos em busca de locais para oviposição (DEGASPARI et al., 1987).

As larvas de *S. levis* são as principais responsáveis pelos danos, pois ao abrirem essas galerias nos rizomas, causam amarelecimento e morte dos perfilhos, prejudicando o desenvolvimento da cultura e, muitas vezes, levando à morte das plantas. Essas falhas no crescimento favorecem a infestação de plantas invasoras, aumentando a competição por nutrientes e água no campo, o que reduz o rendimento das soqueiras (PRECETTI & TERÁN, 1983). O ataque de *S. levis* pode reduzir a produção em até 30 toneladas por hectare ao ano, o que corresponde aproximadamente a 40% de uma produção média da cultura. Além disso, pode causar perdas de até 60% nos perfilhos, diminuindo a longevidade e qualidade do canavial (PINTO et al., 2009; GARCIA & BOTELHO, 2016).

O monitoramento de *S. levis* é essencial para controlar os danos, especialmente em regiões com alta infestação. Na fase adulta, é realizado por meio de armadilhas atrativas compostas por toletes de cana imersos em inseticida, colocados nas bases das touceiras e cobertos com palha (ALMEIDA, 2005).

4.3 Controle de *Sphenophorus Levis*

O controle do *S. levis* é um desafio constante devido à sua habilidade de sobreviver aos métodos tradicionais de manejo. O método mais comum envolve a destruição mecânica das soqueiras durante a reforma do canavial, o que expõe as larvas aos seus predadores e ao ressecamento (PRECETTI & ARIGONI, 1990). Contudo, essa técnica é mais eficaz apenas no primeiro corte, já que muitas larvas sobrevivem alimentando-se da matéria orgânica residual, limitando o sucesso da prática (ALMEIDA, 2005).

O uso de iscas tóxicas, a manutenção de áreas sem vegetação hospedeira e a aplicação de fipronil (Regent 800 WG) são estratégias frequentemente adotadas. No entanto, essas medidas não tenham sido suficientes para conter a expansão da praga em novas áreas (LEITE et al., 2006). Isso destaca a necessidade de alternativas de controle mais eficazes, com foco especial em estratégias biológicas, dado que a praga continua a se expandir (FERREIRA et al., 2024).

Nesse sentido, o controle biológico com o uso de fungos entomopatogênicos tem ganhado destaque, especialmente com espécies como *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin, 1983 (Ascomycota: Hypocreales), que têm demonstrado grande potencial no manejo integrado, reduzindo a necessidade de inseticidas químicos (LOPES et al., 2020). Além de *B. bassiana*, outras espécies como *B. amorpha*, *B. caledonica* e *B. pseudobassiana* foram encontradas no Brasil, sugerindo que podem também ser promissoras para o controle desse inseto (BUSTAMANTE et al., 2019; SOUZA et al., 2020).

Além disso, nematoides entomopatogênicos têm demonstrado resultados promissores no controle de *S. levis*. Pesquisas mostraram que nematoides como *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) e *Steinernema sp* (Rhabditida: Steinernematidae), podem alcançar mortalidades superiores a 70% em larvas de *S. levis* quando aplicados em condições de laboratório e casa de vegetação (POINAR et al., 1992; LEITE et al., 2006). A dosagem recomendada foi de 2,4 juvenis infectivos por cm², equivalente a 1×10^8 juvenis por hectare, resultando em ganhos de produção de até 15 toneladas por hectare em áreas tratadas (LEITE et al., 2006). O controle biológico com nematoides e fungos possui potencial para complementar as práticas de manejo tradicional e integrar programas de controle de pragas (CASTELIANI et al., 2020).

Bactérias entomopatogênicas, como *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 (Bacillales: Bacillaceae), foram utilizados em estudos no controle dessa praga. Embora tenha demonstrado resultados promissores em laboratório, ainda necessitam de mais pesquisas para sua adoção em larga escala no controle de *S. levis* (CICERO et al., 2009).

Um aprimoramento no uso de iscas tóxicas foi feito por Girón-Pérez et al. (2009), que identificaram os entrenós de cana-de-açúcar misturados com melaço a 10% como atrativos eficazes para o controle de adultos de *S. levis*. Esse substrato superou outros materiais testados, como casca de abacaxi e água, oferecendo uma alternativa promissora para o monitoramento e controle da praga.

Do ponto de vista de manejo cultural, é essencial manter as áreas de cultivo sem planta hospedeira por um período superior a três meses, evitando a presença de condições favoráveis para a praga (DINARDO-MIRANDA, 2018). O milho é a única

planta hospedeira conhecida que permite o completo desenvolvimento desse inseto. Além disso, há registros de sua presença em bromeliáceas e algumas gramíneas, no entanto, nessas espécies não é capaz de completar seu ciclo (PRECETTI; ARRIGONI, 1990; BARRETO-TRIANA, 2009).

A adoção de rotações de culturas, preferencialmente com amendoim e soja, e a antecipação do preparo de solo também contribuem para a redução das populações de adultos de *S. levis* (PRECETTI & ARRIGONI, 1990). O plantio de cana-de-açúcar mais tardio, entre março e abril, pode reduzir a densidade populacional da praga, ajudando no controle integrado (BARRETO-TRIANA, 2009).

O uso de produtos fitossanitários químicos é recomendado em dois momentos principais, durante o plantio e no corte das soqueiras, aplicando-se o inseticida diretamente no corte, a uma profundidade de 5 a 10 cm. O efeito do controle químico sobre *S. levis* no canavial geralmente se torna perceptível entre dois e três meses após a aplicação. Aplicações em área total não são recomendadas devido à baixa eficiência observada (DINARDO-MIRANDA, 2018).

Embora existam diversas técnicas e produtos, um dos principais desafios para o sucesso do controle está relacionados ao hábito da praga, que dificulta o contato direto dos inseticidas com as larvas e adultos, que ficam protegidos no interior do rizoma da cana e no solo abaixo da palhada (PRECETTI & ARRIGONI, 1990).

4.4 *Beauveria bassiana*

B. bassiana é um fungo entomopatogênico amplamente utilizado no controle biológico de pragas agrícolas devido à sua eficácia contra uma vasta gama de insetos (BUTT et al., 2016). Primeiramente descrito por Balsamo em 1835 sob o nome de *Botrytis bassiana*, o fungo foi posteriormente classificado como *Beauveria* em 1912 (LIMA, 1989).

Esse fungo pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Cordycipitaceae, sendo classificado inicialmente como um Deuteromiceto devido à sua reprodução assexuada. No entanto, com o avanço da biologia molecular, as espécies do gênero *Beauveria* foram reagrupadas como fungos sexuados (REHNER, 2005).

B. bassiana tem ocorrência cosmopolita, sendo encontrado em regiões temperadas e tropicais ao redor do mundo, sobrevivendo em solos, plantas e insetos (REHNER et al., 2011; BEHIE et al., 2015). Sua ocorrência é registrada em representantes das ordens Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Lepidoptera, Orthoptera, Hymenoptera, Blatodea, Mantodea e Thysanoptera (ZIMMERMANN, 2007).

O modo de ação de *B. bassiana* é baseado na penetração do fungo no tegumento do hospedeiro, realizado por ações mecânicas e enzimáticas, após a adesão dos conídios à cutícula do inseto. A fase de germinação ocorre aproximadamente 12 horas após a inoculação, com penetração no hospedeiro em um período de até 12 horas (BROOME et al., 1976). Após a penetração, o fungo invade a hemolinfa do inseto e se prolifera, formando estruturas leveduriformes. A proliferação fúngica resulta na morte do inseto por esgotamento de nutrientes e

liberação de toxinas, podendo colonizar completamente o inseto em até 72 horas (LUNA-ALVES LIMA & TIGANO, 1989; KHAN et al., 2012).

A temperatura e a umidade são fatores cruciais para a eficácia de *B. bassiana*, influenciando diretamente a germinação e a viabilidade dos conídios, o crescimento vegetativo, a esporulação e a virulência, sendo que a temperatura ideal para esses processos é em torno de 24°C a 26°C (ALEXANDRE et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2016). Fatores ambientais como radiação ultravioleta e competição microbiana podem limitar a eficácia de *B. bassiana* em campo, sendo necessário um manejo cuidadoso em conjunto com outras práticas agrícolas (BATISTA FILHO, 2001).

Este fungo é generalista e, embora não tenha especificidade de hospedeiro, *B. bassiana* é particularmente eficaz em uma ampla gama de pragas agrícolas, como *Bemisia tabaci* Gennadius, 1889 (Hemiptera: Aleyrodidae), *Coccus viridis* Green, 1889 (Hemiptera Coccidae), *Dalbulus maidis* DeLong & Wolcott, 1923 (Hemiptera: Cicadellidae), *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae), *Hypothenemus hampei* Ferrari, 1867 (Coleoptera: Scolytidae), *Tetranychus urticae* Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae), e diversas espécies de curculionídeos como *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae), *C. sordidus*, *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal 1833 (Coleoptera: Curculionidae), *S. levis*, dentre outros (AGROFIT, 2025).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas (LCMAP) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/Unesp) em Jaboticabal, SP.

5.2 Amostragem do solo

Os solos e insetos (Tabela 1) foram obtidos no ano de 2022 a 2024 em áreas representativas das cinco regiões brasileiras (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul). Os solos foram coletados de 0 a 10 cm de profundidade. Após a coleta foram depositados e identificados em sacos plásticos e armazenados em geladeira a 4°C.

Tabela 1 - Localidade, origem e código dos solos utilizados no projeto de prospecção de fungos entomopatogênicos.

Cidade (estado)	Origem do solo	Código
Ariquemes (RO)	Cultivo (milho)	ROC
Ariquemes (RO)	Mata	ROM
Moju (PA)	Cultivo (coco)	PAC
Moju (PA)	Pastagem	PAP
Moju (PA)	Mata	PAM
Cartucho (TO)	Mata	TOM
Picos (PI)	Cultivo (milho)	PIC
Goiatuba (GO)	Cultivo (soja)	GOC
Goiatuba (GO)	Mata	GOM
Vitória (ES)	Área urbana	ESO
São Sebastião do Paraíso (MG)	Cultivo (café)	MGC

São Sebastião do Paraíso (MG)	Mata	MGM
Itanhaém (SP)	Mata	ITL
Taquaritinga (SP)	Cultivo (cana-de-açúcar)	TCC
Jaboticabal (SP)	Cultivo (cana-de-açúcar)	PCC
Jaboticabal (SP)	Cultivo (cana-de-açúcar orgânica)	SJC
Serra Negra (SP)	Cultivo (cana-de-açúcar)	SNC
Rio de Janeiro (RJ)	Área urbana	RJO
Araruna (PR)	Cultivo (soja)	PRC
Araruna (PR)	Mata	PRM
Braço do Trombudo (SC)	Cultivo (mandioca)	SCC
Braço do Trombudo (SC)	Mata	SCM
Passo Fundo (RS)	Cultivo (milho)	RSC

5.3 Isolamento dos fungos entomopatogênicos

5.3.1 Meio de cultura seletivo

Para a obtenção de inóculos fúngicos de *B. bassiana*, foi realizado o método de diluição seriada em câmara de fluxo laminar, a partir de suspensões de solos, seguida de plaqueamento em meios seletivos específicos. Inicialmente, um grama de cada solo homogeneizado foi adicionado em tubos contendo 10 mL de água destilada estéril, transferindo-se 1 mL dessa suspensão homogeneizada em vórtex para tubos com 9 mL até atingir a diluição desejada. Uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição (solução original, 10^{-1} e 10^{-2}) foi inoculada e espalhada com auxílio de uma alça de Drigalski flambada em placas de Petri contendo meio seletivo para isolamento de *Beauveria* spp. e de outros fungos entomopatogênicos do solo de acordo com a metodologia de Alves & Faria (2010) com adaptações.

Esse meio seletivo adaptado foi composto por “BDA” (batata, dextrose e ágar) suplementado com Dodine (0,1 mL/L) e pentabiótico (0,5 g/L). O plaqueamento de cada diluição foi realizado em duplicata. As placas foram mantidas invertidas em câmara climatizada (Biological Oxygen Demand – B.O.D) a uma temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12L:12E de 3 a 7 dias.

Após o crescimento das colônias de fungos (Figura 1) estas foram analisadas macroscopicamente, levando em consideração o tipo morfológico do micélio e a pigmentação, e comparados com outros isolados de *Beauveria* spp. (RODRIGUES et al., 2016; BICH et al., 2021). Aquelas que possuíam características semelhantes a *Beauveria* spp., como micélio pulverulento e coloração branca a levemente amarelada (MCCOY et al., 1988), foram repicadas em placas com meio de cultura “BDA” acrescido de pentabiótico 0,5 g/L em câmara de fluxo laminar. A repicagem foi feita utilizando uma alça de platina flambada e foram feitos três pontos (Figura 2) em cada extremidade da placa até a obtenção da colônia pura. Após a obtenção da colônia sem a presença de contaminantes foi realizada a repicagem em câmara de fluxo laminar utilizando alça de platina flambada em placa cheia contendo meio de cultura “BDA” acrescido de pentabiótico 0,5 g/L (Figura 3). Em uma mesma unidade amostral, quando encontrados isolados do mesmo gênero com características morfológicas distintas, ambos foram purificados.



Figura 1 - Crescimento de fungos presentes no solo em placa de Petri com meio de cultura.

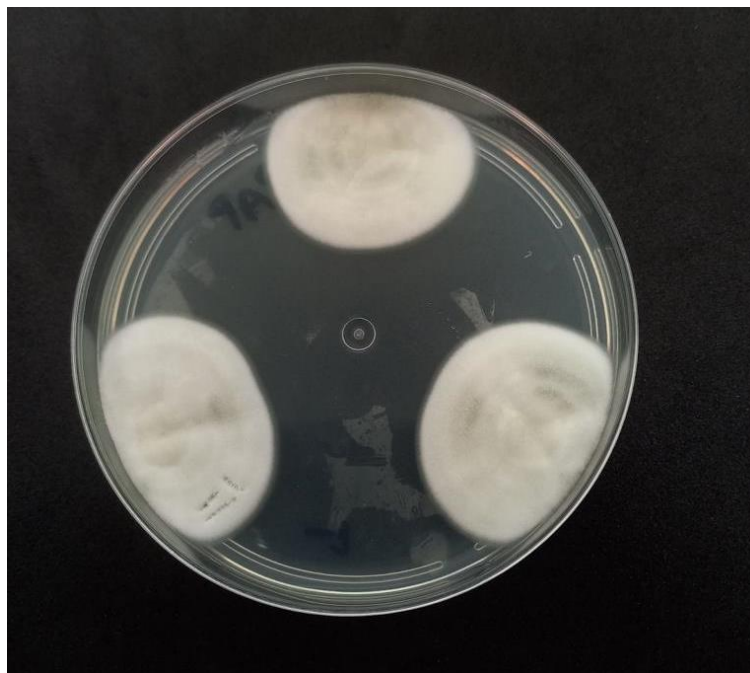


Figura 2 - Repicagem em 3 pontos para obtenção de colônia fúngica pura.



Figura 3 – Repicagem em placa cheia da colônia fúngica purificada.

5.3.2 Método *Insect bait*

O método *Insect bait* foi realizado seguindo a metodologia de Inglis et al. (2012). Foram utilizados 55 g de cada solo homogeneizado em potes plásticos de 100 mL. Em cada pote contendo solo, foram depositados dez insetos da espécie *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) em fase larval de 2° a 4° ínstar. Os potes foram armazenados em câmara climatizada (Biological Oxygen Demand – B.O.D) a uma temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotoperíodo de 24E. Nos primeiros sete dias os potes foram virados diariamente para que houvesse estímulo à movimentação dos insetos. Os solos foram umedecidos com água deionizada sempre que necessário.

A partir do 4º dia foi realizada a inspeção das larvas mortas, e a cada três dias os insetos mortos foram contabilizados e desinfetados de contaminantes seguindo a

metodologia de Donini et al. (2005), com adaptações na duração de imersão dos insetos em cada solução. Foram utilizadas três soluções: na primeira o inseto foi imerso por 1 minuto em álcool 70%, em seguida, 30 segundos em hipoclorito de sódio (20%) e, depois, 1 minuto em água deionizada. Após essas imersões, o inseto morto foi colocado utilizando pinça anatômica de dissecação em papel toalha até secar e, posteriormente, passado para a placa de ELISA, a qual dispunha de algodões umedecidos para favorecer a esporulação do fungo. As placas de ELISA foram armazenadas em câmara climatizada (Biological Oxygen Demand – B.O.D) a uma temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12L:12E. Após a colonização do fungo (Figura 4), estes foram repicados com auxílio de uma alça de platina flambada em meios de cultura contendo “BDA” acrescido de pentabiótico 0,5 g/L em câmara de fluxo laminar. Após a obtenção da colônia pura, foi realizado o esgotamento em câmara de fluxo laminar utilizando alça de platina flambada em placa cheia contendo meio de cultura “BDA” acrescido de pentabiótico 0,5 g/L.



Figura 4 - *Tenebrio molitor* colonizado por fungo entomopatogênico.

5.3.3 Insetos mortos em campo

Os insetos mortos em campo que apresentavam características de colonização fúngica foram levados ao laboratório, onde foram desinfetados de contaminantes (DONINI et al., 2005) utilizando álcool 70%, hipoclorito de sódio (20%) e água deionizada e transferidos para a placa de ELISA utilizando pinça anatômica de dissecação. Nos casos em que ocorreram esporulação fúngica, foram repicados em câmara de fluxo laminar fazendo três pontos nas extremidades da placa de Petri com auxílio de uma alça de platina flambada em meios de cultura contendo “BDA” acrescido de pentabiótico 0,5 g/L. Após a obtenção da colônia pura foi realizado o esgotamento utilizando alça de platina flambada em placa cheia contendo meio de cultura “BDA” acrescido de pentabiótico 0,5 g/L em câmara de fluxo laminar.

5.4 Identificação de gênero

Todas as colônias com características de fungos entomopatogênicos que cresceram no meio seletivo e nos insetos foram contabilizadas. Os fungos foram identificados de acordo com seu gênero sendo levado em conta suas características microscópicas e macroscópicas. Os isolados que apresentaram aspectos macroscópicos semelhantes aos de *Beauveria* spp. foram analisados em microscópio óptico ZIESS. As características microscópicas analisadas foram os conidióforos, conídios e hifas, e, posteriormente, comparadas com as estruturas de chaves taxonômicas de *Beauveria* spp. para a confirmação do gênero (REHNER et al., 2011; BICH et al., 2021).

Para a análise, foi necessário fazer a repicagem do isolado em placa de Petri com meio de cultura “BDA” acrescido de pentabiótico 0,5 g/L utilizando alça de platina

flambada. Após 6 a 8 dias foram feitos pequenos cortes quadrangulares com auxílio de uma espátula em chapa de aço de 15 cm nas extremidades da colônia, retirando entre o final da colônia e o meio de cultura onde houve baixo crescimento fúngico. Foram depositados dois a três desses quadrados sobre cada uma das extremidades de uma lâmina e cobertos com lamínulas (Figura 5). No microscópio foram utilizados os aumentos de 20x e 40x para identificação das estruturas.



Figura 5 - Cortes na colônia fúngica para visualização em microscópio.

5.5 Armazenamento e preservação dos isolados fúngicos

5.5.1 Criopreservação de isolados fúngicos a -80°C

Após a purificação dos isolados no esgotamento, eles foram mantidos em câmara climatizada (Biological Oxygen Demand – B.O.D) a uma temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12L:12E de 8 a 12 dias para que houvesse o crescimento da colônia. Após o crescimento, foram realizados cortes circulares da colônia fúngica juntamente com o meio seletivo com a utilização da base de ponteiros de 1000 μL estéreis em câmara de fluxo laminar (Figura 6).

Em cada criotubo foram depositados 4 discos circulares de colônia fúngica do mesmo isolado, e dentro de cada um desses foi aplicado 1 mL de uma solução com 10% de glicerol e 90% de água deionizada estéril (CAMPOS et al., 2004). Esse armazenamento foi feito em duplicata, e os criotubos foram identificados e armazenados em caixas (Figura 7), e então foram levados a um ultrafreezer com temperatura de -80°C .



Figura 6 - Corte dos discos circulares de colônia fúngica para o armazenamento do isolado em ultrafreezer a -80°C .

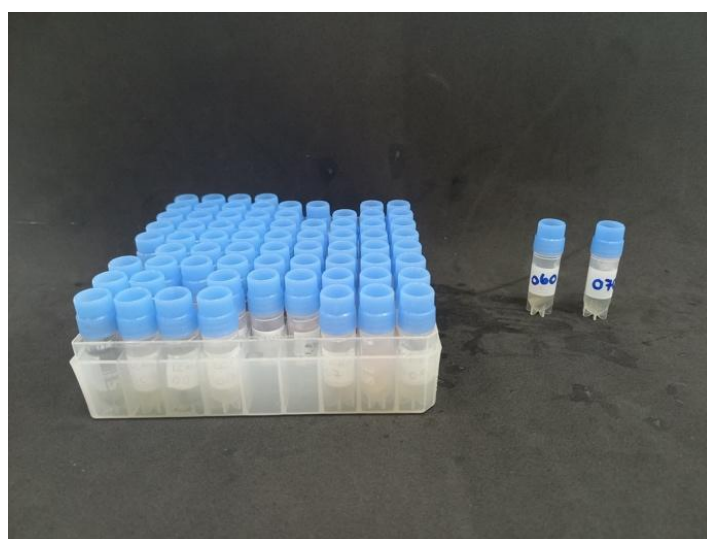


Figura 7 - Criotubos contendo discos fúngicos armazenados em ultrafreezer a -80°C .

5.5.2 Armazenamento em óleo mineral

Os isolados também foram armazenados em duplicata em óleo mineral, seguindo a metodologia de BUELL & WESTON (1947). Os tubos de vidro foram autoclavados contendo meio de cultura BDA e após estéreis os fungos foram inoculados com auxílio de uma alça de platina flambada em câmara de fluxo laminar. Posteriormente esses tubos foram levados a uma câmara climatizada (Biological Oxygen Demand – B.O.D) a uma temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12L:12E e lá permaneceram com a tampa semiaberta. Após 10 dias, com o crescimento da colônia dentro dos tubos de vidro, eles foram levados à câmara de fluxo laminar onde caso estivesse com a colônia pura era aplicado 3 ml de óleo mineral. Posteriormente esses tubos eram fechados e armazenados em temperatura ambiente (Figura 8).

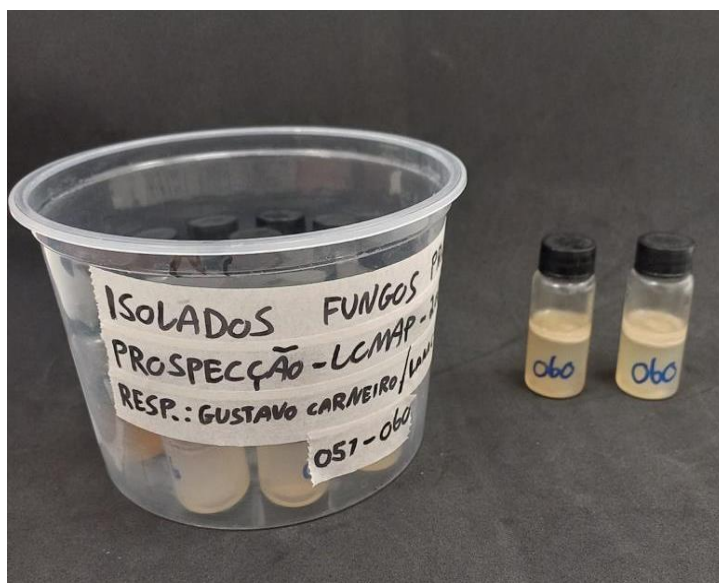


Figura 8 - Tubos de vidro com crescimento fúngico armazenado em óleo mineral.

5.6 Coleta de *Sphenophorus levis*

Para coleta de *S. levis* foi utilizado o método de iscas armadilhas de Precetti & Terán (1983). Para isso, toletes de cana-de-açúcar de aproximadamente 30 cm foram cortados ao meio e depositados de forma em que a parte interior do colmo ficasse em contato com o solo, próximos à base da planta e cobertos com palha. Após 48 a 72 horas as iscas foram analisadas, e os insetos presentes foram retirados (Figura 9). As mesmas iscas eram utilizadas durante 10 dias. Os insetos coletados foram acondicionados em caixas plásticas e levados ao laboratório.

No laboratório, esses insetos foram acondicionados em câmara climatizada (Biological Oxygen Demand – B.O.D) a uma temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotoperíodo de 24E, dentro de potes plásticos retangulares de 4,5 litros contendo furos na tampa para circulação de ar. Em cada caixa foram depositados 100 insetos contendo três toletes de cana-de-açúcar com aproximadamente 30 cm rachados ao meio, os quais eram trocados a cada 3 dias e serviam como fonte de alimento. Os insetos coletados em campo ficaram em observação por no mínimo 15 dias antes de serem utilizados nos bioensaios.



Figura 9 - Iscas de cana-de-açúcar para coleta de *Sphenophorus levis*.

5.7 Bioensaio

Cada isolado identificado como *Beauveria* spp. foi inoculado em placas de Petri com meio de cultura “BDA” acrescido de pentabiótico 0,5 g/L em câmara de fluxo laminar, sendo chamados de placas-mãe. Foram utilizados os isolados armazenados em óleo mineral e em criopreservação. O inóculo do óleo mineral era retirado em câmara de fluxo laminar por meio da raspagem da colônia utilizando uma alça de platina flambada e repicado na placa em todo meio de cultura. Os criotubos armazenados em ultrafreezer eram mantidos por 10 minutos em geladeira e, posteriormente, 20 minutos em temperatura ambiente até estarem totalmente descongelados. Então, o disco era retirado em câmara de fluxo laminar com auxílio uma pinça anatômica de dissecação flambada e colocado no centro da placa com meio de cultura. Essas placas de Petri foram mantidas por 7 dias em câmara climatizada (Biological Oxygen Demand – B.O.D) a uma temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12L:12E.

Com o crescimento desses microrganismos na placa-mãe foram realizadas 8 placas-filhas em câmara de fluxo laminar por meio da raspagem da colônia da placa-mãe utilizando uma alça de platina flambada e sendo espalhadas em toda superfície de cada uma das placas de Petri com meio de cultura “BDA” acrescido de pentabiótico 0,5 g/L mantidas por 13 dias em câmara climatizada (Biological Oxygen Demand – B.O.D) a uma temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12L:12E. Após o desenvolvimento das colônias, cada uma das placas foram raspadas em câmara de fluxo laminar utilizando uma espátula em chapa de aço de 15 cm flambada. Todo conteúdo raspado foi passado para um tubo de ensaio com 10 mL de água deionizada autoclavada com Tween 80 a 0,05%, sendo considerada a concentração original.

Para obter a concentração desejada foi realizada a diluição seriada. 1 mL da concentração original homogeneizada em vórtex foi diluída em tubo de ensaio contendo 9 mL de água deionizada autoclavada, com Tween 80 a 0,05%, sendo este a concentração 10^{-1} , realizando o mesmo procedimento nos demais tubos de forma progressiva até atingir a diluição 10^{-4} . O número de conídios foi contado em câmara de Neubauer utilizando a concentração 10^{-3} e 10^{-4} . Uma alíquota foi inserida nas canaletas da câmara até que os dois campos quadriculados fossem preenchidos. Foi aguardado 5 minutos para que os conídios estabilizassem e decantassem. A contagem foi realizada através de um microscópio óptico ZIESS com objetiva de 40x. Os conídios foram contados em todos quadrados dos 4 quadrantes maiores da câmara, onde foi realizada uma média de cada quadrante. Foi realizada a contagem no campo quadriculado superior e inferior e feita uma média. O cálculo após a contagem foi $\text{Conídios/mL} = \text{média de conídios} \times 10^4 \times 10^{\text{fator de diluição}}$. Sabendo o

número de conídios da concentração original, foi realizada uma suspensão adicionando água com Tween 80 a 0,05% até atingir a concentração.

O teste de mortalidade foi realizado utilizando a metodologia descrita por Agostini et al. (2015), com adaptação no tempo de imersão. Cada indivíduo adulto de *S. levis* foi imerso manualmente na suspensão com concentração de 1×10^8 conídios/mL por 30 segundos, para garantir uma maior uniformidade de contato com a solução (Figura 10). Para a testemunha, os insetos foram imersos em água estéril com Tween 80 a 0,05%. Foram realizadas 4 repetições para cada isolado do gênero *Beauveria*, com 8 insetos por repetição, totalizando 32 insetos por isolado. Após a imersão, os insetos foram acondicionados em potes plásticos com pedaços de cana-de-açúcar e furos na tampa para ventilação (Figura 11). Esses potes foram acondicionados em câmara climatizada (Biological Oxygen Demand – B.O.D) a uma temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 24E. Os pedaços de cana-de-açúcar foram trocados a cada 3 dias. A avaliação de mortalidade foi realizada por 21 dias consecutivos. Os insetos mortos foram desinfetados (DONINI et al., 2005) com álcool (70%), hipoclorito de sódio (20%) e água deionizada e armazenados em câmara úmida para que os fungos pudessem esporular e assim confirmar que a mortalidade foi devido a infecção fúngica.

Foram realizados testes de concentração letal média (CL_{50}) e tempo letal médio (TL_{50}) somente para aqueles isolados que foram promissores no controle de adultos de *S. levis*, devido a impossibilidade da produção desse inseto em laboratório e a dificuldade de coleta desse inseto em campo. As concentrações selecionadas foram estabelecidas a partir de testes preliminares, com o objetivo de identificar uma que reduzisse a população em aproximadamente 10% e outra que causasse uma redução acima de 90%. As concentrações adicionais foram distribuídas entre esses

valores extremos (ROBERTSON et al., 1984). A metodologia utilizada nestes testes foi a mesma utilizada no teste de mortalidade.

Os dados obtidos foram transformados em médias e, posteriormente, submetidos à análise de variância por meio do teste F. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância no programa SPEED Stat 3.4. Para o cálculo da CL₅₀ (concentração letal média) e TL₅₀ (tempo letal médio) foi utilizado o programa GraphPad Prism 10.



Figura 10 - Imersão de *Sphenophorus levis* em solução fúngica.



Figura 11 - Potes plásticos contendo *Sphenophorus levis* após o bioensaio com isolados fúngicos do gênero *Beauveria*.

5.8 Análise molecular de *Beauveria* spp.

Para extração de DNA, o isolado foi cultivado em meio de cultura líquido BD (batata-dextrose). Foi utilizado como inóculo um disco circular de colônia fúngica da criopreservação em ultrafreezer. Foi realizado o processo de descongelamento do criotubo, descrito em bioensaio (tópico 5.7), retirando o disco utilizando uma pinça anatômica de dissecação flambada na câmara de fluxo laminar e depositado no meio de cultura. Esse meio foi armazenado em câmara climatizada (Biological Oxygen Demand – B.O.D) a uma temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotoperíodo de 24E por oito dias. Após o período de incubação (Figura 12), o micélio foi peneirado, lavado com água esterilizada e secado em temperatura ambiente por 12 horas. A maceração do micélio seco foi realizada com nitrogênio líquido até a formação de um pó, do qual 0,1 g foi transferido para microtubos de 2,0 mL. A metodologia de extração de DNA seguiu de acordo com o protocolo otimizado por SOUZA (2015).

Para identificação da espécie de *Beauveria*, foi realizada a amplificação de um fragmento de 650 pb da região ITS1-5.8S-ITS2 rDNA utilizando-se os oligonucleotídeos ITS1/ITS4 (WHITE et al., 1990). A reação de PCR foi composta por tampão 1X (20mM Tris-HCl pH 8,4; 50mM KCl), 2 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP, 0,5 U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen, Waltham, EUA), 4 pmol de cada oligonucleotídeo, 60 ng de DNA e água ultrapura para 20 µL.

A amplificação foi realizada em um termociclador Nexus (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), programado para realizar um ciclo a 95°C por 3 minutos; 35 ciclos a 94°C por 30 segundos; 60°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos, e, para finalizar, um ciclo a 72°C por 10 minutos. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose 1% após eletroforese. O produto de PCR foi purificado utilizando-se o conjunto enzimático ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e então submetido à PCR de sequenciamento utilizando-se o kit do Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Waltham, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante, e os mesmos oligonucleotídeos utilizados para obtenção dos produtos de PCR.

O sequenciamento foi realizado em um sequenciador ABI3130 (Applied Biosystems, Waltham, USA). Os eletroferogramas obtidos foram previamente preparados pelo software DNA Sequencing Analysis Versão 6.0 e, posteriormente, analisados pelo pacote de programas Phred/Phrap/Consed (EWING & GREEN, 1998; GORDON et al., 1998), para obtenção da sequência consenso composta apenas por bases com qualidade phred maior que 20. As sequências de DNA qualificadas foram comparadas com demais sequências depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank), empregando-se a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). As sequências de DNA do estudo e demais sequências obtidas do banco de dados foram alinhadas pela ferramenta MUSCLE (EDGAR, 2004).

A árvore filogenética foi obtida pelo software MrBayes 3.2.3 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) utilizando-se o algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC), o modelo de substituição 6 e distribuição gamma, segundo o Critério de Informação de Akaike (AIC) (POSADA; BUCKLEY, 2004). Foram realizadas quatro corridas independentes com 10.000.000 de gerações, sendo as cadeias amostradas a cada 200 gerações. Ao final das análises, obtendo-se desvio padrão inferior a 0,01%, 25% das árvores geradas inicialmente foram descartadas.



Figura 12 - Crescimento de isolados fúngicos após incubação.

6. RESULTADOS

Foram isolados 106 fungos com potencial entomopatogênico de diferentes locais e gêneros das amostras de solos e insetos. Após serem submetidos a análise macroscópica e microscópica (Figura 13) para a determinação do gênero, foram identificados 9 isolados que apresentavam características semelhantes a *Beauveria* spp. Os isolados advindos de local e origem de solo iguais que apresentaram diferenças macroscópicas significativas foram contabilizados separadamente (Figura 14).

Os fungos do gênero *Beauveria* spp. prospectados neste estudo foram originários de diversas regiões do Brasil, incluindo a Região Norte (Rondônia e Pará), Centro-Oeste (Goiás) e Sudeste (São Paulo). Esses fungos foram coletados de ambientes naturais, como matas, e agrícolas, especificamente de áreas de cultivo de cana-de-açúcar. Os isolados foram obtidos por meio das três técnicas de isolamento aplicadas ao longo do trabalho.

No bioensaio houve uma baixa mortalidade no controle, com uma média de 6,25%, sem evidência de infecção fúngica. Dos isolados identificados como *Beauveria* spp. 4 deles foram considerados patogênicos aos adultos de *S. levis*, pois apresentaram diferença significativa do controle, causando mortalidade que variou de 28% a 75% (Tabela 2) (Gráfico 1).

O LCMAP 078 foi o mais promissor, em que foi isolado a partir da *técnica Insect bait* de um solo de cultivo de cana-de-açúcar em Jaboticabal (SP). Os insetos imersos nesse isolado apresentaram mortalidade a partir do 4º dia e mortalidade final de 75%. Quando colocados em placas de ELISA, os insetos mortos apresentaram uma confirmação de mortalidade fúngica de 92,3% (Figura 15).

A concentração letal média (CL_{50}) do isolado LCMAP 078 para *S. levis* foi de $2,67 \cdot 10^7$ (Tabela 3) (Gráfico 2). O tempo letal médio (TL_{50}) desse isolado para *S. levis* na concentração $1 \cdot 10^8$ foi de 8,791 dias, na concentração $1 \cdot 10^9$ foi de 6,329 dias e na concentração $1 \cdot 10^{10}$ foi de 5,398 (Tabela 4). Na concentração $1 \cdot 10^6$ houve uma mortalidade de 6,25%, na concentração $1 \cdot 10^9$ de 93,75% e na concentração $1 \cdot 10^{10}$ de 100%.

O isolado LCMAP 078 foi cultivado em meio líquido BD para que fosse possível realizar sua análise molecular. Esse isolado apresentou 100% de identidade com a espécie *B. bassiana* quando comparado com as sequências do banco de dados do NCBI. Na árvore filogenética bayesiana (Figura 16), o isolado LCMAP 078 está agrupado em um clado que inclui outros isolados de *B. bassiana* oriundos do Brasil e de outros países, indicando que esses isolados compartilham uma alta proximidade genética. Essa proximidade é evidenciada pelo alto valor de suporte filogenético, reforçando a robustez das relações evolutivas apresentadas.



Figura 13 – Análise microscópica de conidióforos, conídios e hifas dos isolados prospectados.

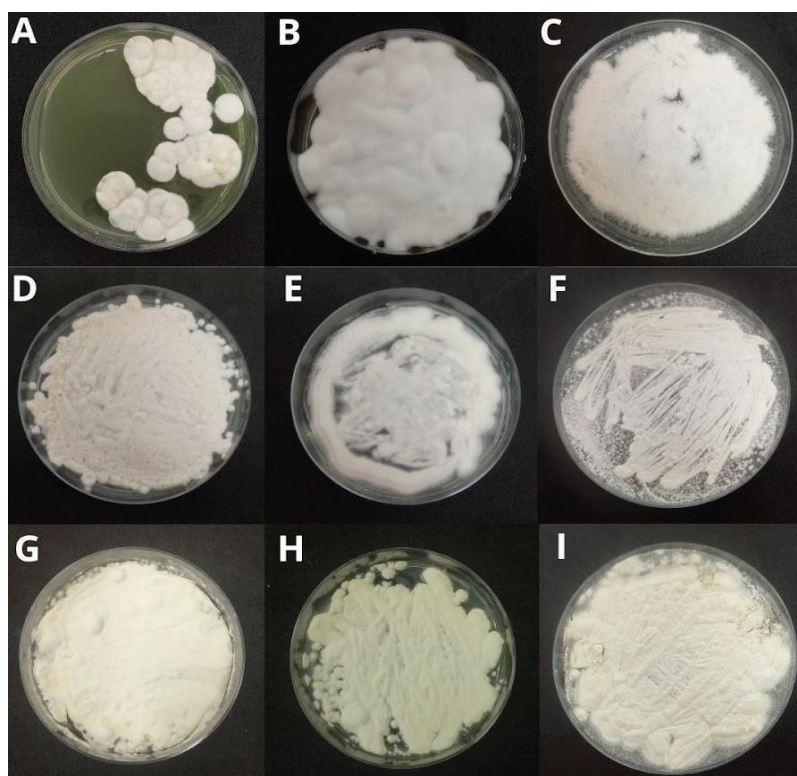


Figura 14 - Isolados do gênero *Beauveria*, LCMAP 002 (A), LCMAP 018 (B), LCMAP 060 (C), LCMAP 065 (D), LCMAP 070 (E), LCMAP 077 (F), LCMAP 078 (G), LCMAP 079 (H) e LCMAP 106 (I).

Tabela 2 – Teste de mortalidade de isolados fúngicos prospectados a partir de solos e insetos contra adultos de *Sphenophorus levis*.

Isolado	Mortalidade total (%) + E.P.	Mortalidade confirmada (%)	Local	Origem	Isolamento
Testemunha	6,25 ± 3,61 de	0	-	-	-
LCMAP 002	3,13 ± 3,13 e	0	Goiatuba (GO)	Mata	Meio seletivo
LCMAP 060	3,13 ± 3,13 e	0	Moju (PA)	Mata	Meio seletivo
LCMAP 018	6,25 ± 6,25 de	0	Ariquemes (RO)	Mata	Meio seletivo
LCMAP 070	9,38 ± 6,44 de	0	Moju (PA)	Mata	Meio seletivo
LCMAP 065	12,50 ± 5,10 de	0	Moju (PA)	Mata	Meio seletivo
LCMAP 079	28,13 ± 5,98 cd	77,8	Guariba (SP)	Cultivo	Inseto morto (<i>S. levis</i>)
LCMAP 106	43,75 ± 4,11 bc	92,8	Jaboticabal (SP)	Cultivo	Inseto morto (<i>S. levis</i>)
LCMAP 077	62,50 ± 5,10 ab	90	Jaboticabal (SP)	Cultivo	Inseto morto (Hymenoptera)
LCMAP 078	75,00 ± 5,10 a	91,7	Jaboticabal (SP)	Cultivo	Insect bait (<i>T. molitor</i>)

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

E.P.: Erro padrão;

Gráfico 1 - Avaliação da mortalidade de isolados fúngicos prospectados de solos e insetos em adultos de *Sphenophorus levis*.

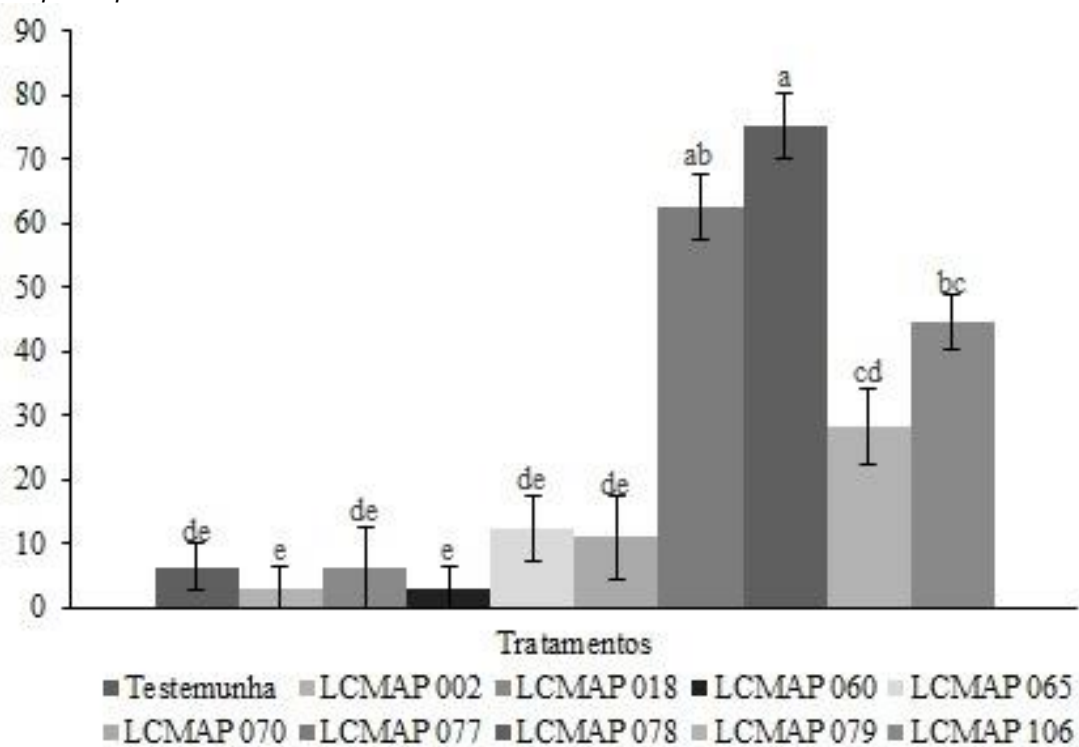


Figura 15 – Colonização fúngica do isolado LCMAP 078 em adultos de *Sphenophorus levis*.

Tabela 3 - Concentração letal média (CL₅₀) de adultos de *Sphenophorus levis* imersos no isolado LCMAP 078 com diferentes concentrações.

Isolado	n	CL ₅₀ (IC 95%) (x10 ⁷ esporos/mL)	Slope ± EP	χ ²	GL
LCMAP 078	32	2,67 (1,94 – 3,68)	0,80 ± 0,01	0,99	3

Gráfico 2 – Concentração letal média (CL₅₀) de adultos de *Sphenophorus levis* imersos no isolado LCMAP 078 com diferentes concentrações.

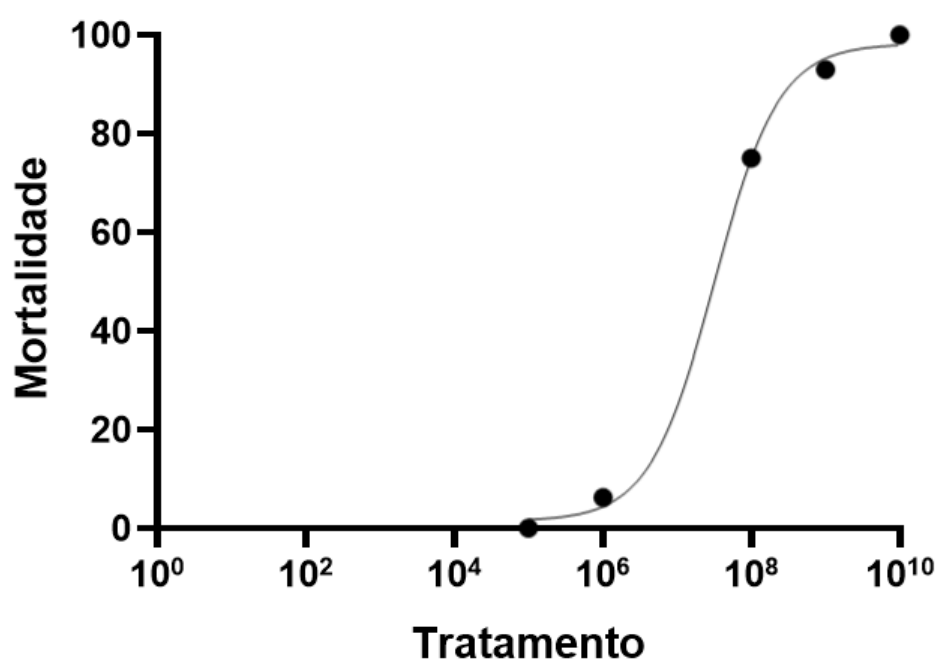


Tabela 4 – Tempo letal médio (TL₅₀) de adultos de *Sphenophorus levis* imersos no isolado LCMAP 078 com diferentes concentrações.

Tratamentos (LCMAP 078)	n	TL ₅₀ (IC 95%) (dias)	Slope ± EP	χ ²	GL
1.10 ⁸	32	8,791 (7,610 – 10,140)	1,50 ± 0,06	0,90	9
1.10 ⁹	32	6,329 (5,624 – 6,988)	3,56 ± 0,07	0,94	9
1.10 ¹⁰	32	5,398 (4,910 – 5,830)	4,29 ± 0,05	0,96	9

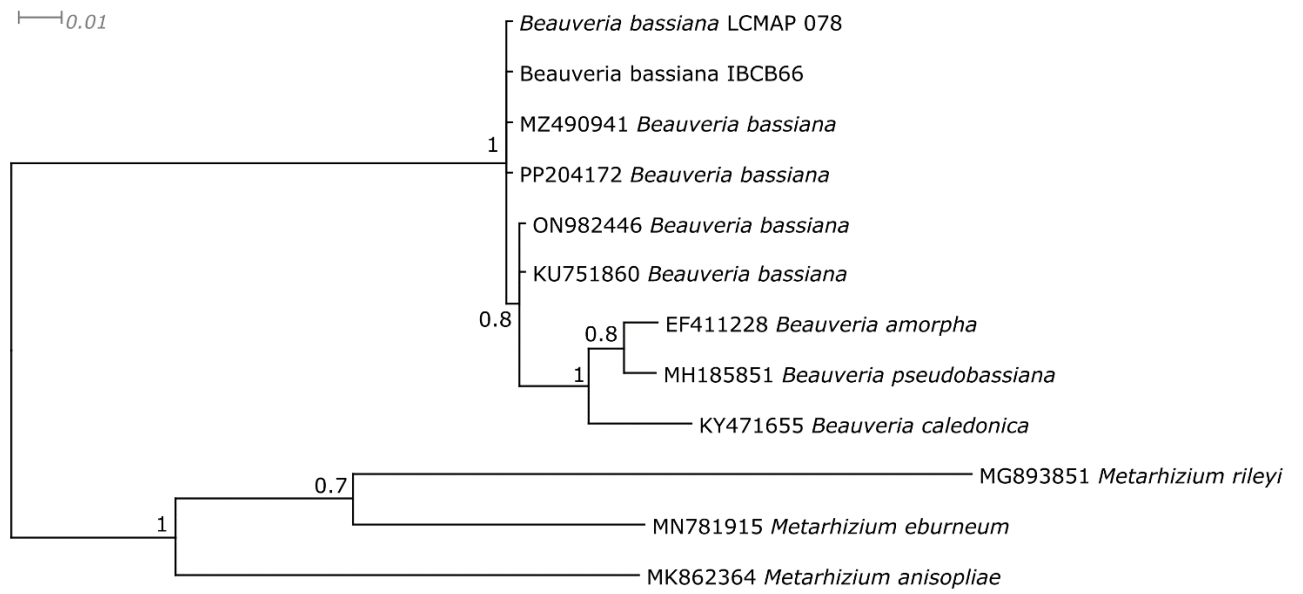


Figura 16 - Análise bayesiana de sequências da região ITS rDNA de isolados de *Beauveria* spp.; Grupo externo: *Metarhizium* spp.; Números nos internódios: valores de suporte do clado.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo contribuiu significativamente ao prospectar mais de cem fungos com potencial entomopatogênico, provenientes de diversas regiões do Brasil e de diferentes ecossistemas, como áreas de cultivo de cana-de-açúcar e áreas de mata. Dentre os fungos isolados, somente 9 foram identificados como semelhantes a *Beauveria spp.*, sendo que 4 apresentaram patogenicidade a adultos de *S. levis*. Nenhum dos isolados patogênicos foram obtidos pelo método com meio seletivo, o que sugere que esse meio específico não foi eficaz para isolar *B. bassiana*.

Uma possível explicação para isso é que o crescimento das colônias de *Beauveria* tende a ser mais lento do que o de outras espécies de fungos, o que pode dificultar seu desenvolvimento em ambientes com competição intensa, como no caso do uso do meio seletivo. Além disso, a baixa obtenção de *B. bassiana* por outros métodos de isolamento pode estar relacionada às condições inadequadas durante a coleta e armazenamento do solo. Grande parte das amostras foi coletada por terceiros, o que impediu garantir a correta metodologia de coleta e armazenamento. Isso pode ter criado condições desfavoráveis à sobrevivência de *B. bassiana*, comprometendo seu isolamento.

Embora alguns isolados fúngicos neste estudo não tenham demonstrado patogenicidade ou apresentaram baixa patogenicidade contra adultos de *S. levis*, isso não implica que sejam irrelevantes. Esses isolados podem ter potencial patogênico para outras espécies de pragas, sendo ainda possível que alguns desses isolados pertençam a outros gêneros de fungos, como *Pochonia*, um nematicida biológico (ZINGER et al., 2021). É possível, também, que esses isolados tenham capacidades de promoção de crescimento de plantas, atuando como bioestimulantes, melhorando

a absorção de nutrientes (RESENDE et al., 2004), ou induzindo respostas de defesa nas plantas, sendo antagonistas de fitopatógenos (SANDRI, 2024).

O isolado de *B. bassiana* LCMAP 078 apresentou uma taxa de mortalidade de 75% contra adultos de *S. levis* numa concentração de 1×10^8 esporos/mL. Além disso, a concentração letal média (CL₅₀) do isolado LCMAP 078 foi de $2,67 \cdot 10^7$ conídios/mL, indicando que é necessária uma concentração relativamente baixa do fungo para causar mortalidade significativa em adultos de *S. levis*. Isso demonstra a alta virulência do isolado, um aspecto positivo para o controle biológico em campo.

Outro aspecto positivo desse isolado foi o tempo letal médio (TL₅₀), que variou conforme a concentração de esporos, 8,791 dias para 1×10^8 esporos/mL, 6,329 dias para 1×10^9 , e 5,398 dias para 1×10^{10} . Os dados do TL₅₀ indicam que a concentração de 10^8 resulta em um tempo letal mais longo, enquanto 10^9 e 10^{10} reduzem mais rapidamente a população. A taxa de mortalidade na concentração 10^9 foi de 93,75% e na concentração 10^{10} de 100%. Ademais, houve sobreposição nos intervalos de confiança entre 10^9 e 10^{10} , mostrando que não há grande vantagem significativa que justifique o aumento da concentração acima de 10^9 .

Comparando com estudos anteriores, Badilla & Alves (1991) relataram taxas de mortalidade de 24,6% numa concentração de $8 \cdot 10^8$ esporos/mL e de 74,6% em $8 \cdot 10^{11}$ esporos/mL para adultos de *S. levis* imersos em solução utilizando *B. bassiana* (ALVES, 1992). No trabalho de Simi (2014), foram testados diversos isolados de *B. bassiana* em adultos de *S. levis*, utilizando a concentração $1 \cdot 10^8$. O isolado mais eficiente no controle apresentou 80% de mortalidade. No entanto, o isolado IBCB 66, amplamente utilizado em produtos comerciais, apresentou baixa eficiência no

controle de adultos de *S. levis*, não apresentando diferença significativa em relação à testemunha.

Adicionalmente, alguns isolados de *B. bassiana* também mostram-se eficazes contra outras pragas de Curculionidae. No trabalho de Costa et al. (2010) isolados do fungo demonstraram mortalidade de 89 a 100% e TL_{50} média de 7,5 dias contra o gorgulho-da-bananeira (*C. sordidus*) imersos numa solução com concentração 2.10^8 esporos/mL, enquanto Giometti et al. (2010), observou mortalidade de 85% contra o bicudo-do-algodoeiro (*A. grandis*). Esses estudos com isolados de *B. bassiana* demonstraram resultados próximos ao obtido com o LCMAP 078 em adultos de *S. levis*, sugerindo que ele possa apresentar desempenhos promissores no controle de outras espécies de Curculionidae. Além disso, eficácia demonstrada de *B. bassiana* em campo contra larvas de *S. levis* (PAGLIARANI, 2012) e outras pragas da cana-de-açúcar, como *D. saccharalis* (GIOMETTI et al., 2006; GARCÍA et al., 2018) abre a possibilidade de explorar o isolado LCMAP 078 em laboratório contra as larvas de *S. levis* e outras espécies de pragas.

Para explorar todo o potencial dos isolados prospectados utilizados neste trabalho, é interessante, em testes futuros, avaliar os isolados que não apresentaram patogenicidade contra adultos de *S. levis* em contextos de controle de nematoides fitófagos, antagonistas de fitopatógenos e promotores de crescimento de plantas, a fim de analisar se possuem outras aplicabilidades. Para os isolados que apresentaram patogenicidade com mortalidade baixa e média, é relevante testá-los contra outras pragas, a fim de verificar se há maior especificidade para determinadas espécies. Já o LCMAP 078, que demonstrou resultados promissores, necessita de avaliação adicional de sua interação com outros organismos em laboratório e em

campo, além de estudos de longo prazo para testar sua persistência e eficácia em diferentes condições ambientais.

Também é essencial realizar o sequenciamento genômico completo, utilizando marcadores moleculares mais informativos, para analisar a distância genética do LCMAP 078 em relação às outras cepas de *Beauveria*. Isso é importante, pois embora o isolado tenha sido obtido do solo, não podemos garantir que se trate, de fato, de uma nova cepa. Existe a possibilidade de que o isolado tenha origem em um produto previamente aplicado na área, cujos resíduos ainda estejam presentes no solo. Portanto, o sequenciamento genético é fundamental para confirmar se o isolado representa uma cepa distinta, com diferenças genéticas significativas em relação às cepas utilizadas em produtos comerciais, o que indicaria uma variabilidade genética que pode trazer características vantajosas.

8. CONCLUSÕES

- Houve uma baixa obtenção de fungos classificados como *Beauveria* spp. em comparação ao número de total de isolados;
- Dos 9 isolados considerados como *Beauveria* spp. somente 4 foram patogênicos aos adultos de *Sphenophorus levis*;
- As técnicas de coleta de insetos mortos em campo e *Insect bait* foram as formas de isolamento que obtiveram fungos entomopatogênicos;
- Os isolados que não apresentaram mortalidade a adultos de *S. levis* devem ser analisados em outros contextos;
- Os isolados que apresentaram baixa ou média mortalidade a adultos de *S. levis* devem ser utilizados em bioensaio com outras espécies de pragas;
- O isolado LCMAP 078 apresentou a maior mortalidade a adultos de *S. levis* e pertence a espécie *Beauveria bassiana*;
- É necessário realizar o teste de perfil genético para confirmar que o isolado LCMAP 078 se trata de uma nova cepa;
- Testes em campo e exploração de outros alvos de pragas são essenciais para avaliar as características do LCMAP 078 e seu potencial de comercialização.

9. LITERATURA CITADA

AGOSTINI, T. T.; AGOSTINI, L. T.; DUARTE, R. T.; LINHARES VOLPE, H. X.; SALAS, C.; POLANCZYK, R. A. Eficiência de fungos entomopatogênicos para o controle de *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) em condições de laboratório. *Comunicata Scientiae*, 6(1), 90–96, 2015.

AGROFIT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários. 2025. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons [acessado em Jan 2025].

ALEXANDRE, T.M.; ALVES, L.F.A.; NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B. Efeito da temperatura e cama do aviário na virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) para o controle do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, v.35, n.1, p.75-82, 2006.

ALMEIDA, J. E. M.; ROCHA, T. C.; BATISTA FILHO, A. Desenvolvimento de método para extração física de conídios de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para formulação pó seco e molhável de bioinseticidas. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 74, n. 4, p. 369-371, 2007.

ALMEIDA, L. C. Bicudo da cana-de-açúcar. *Boletim Técnico C.T.C.*, Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba, p. 1-3, 2005.

ALMEIDA, A. M. B.; de BATISTA, F. A.; TAVARES, F. M.; et al. Screening of *Beauveria bassiana* for the control of *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) (Coleoptera: Curculionidae). *Arch Biol Inst (São Paulo)*. ;76(3):489–93, 2009.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, La Jolla, v. 215, p. 403-410, 1990.

ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, v. 22, n. 6, p. 711–728, 1 dez. 2013.

ALVES, R. T.; FARIA, M. Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos. Planaltina: Embrapa Cerrados, 50 p, 2010.

ALVES, S. B. Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 27, p. 77-86, 1992.

AVILEZ, A. M. A.; HERNANDEZ, F. B. T.; BISPO, R. C.; GIOVANELLI, L. B. Necessidade hídrica da cana-de-açúcar no Noroeste Paulista. *Irriga*, Botucatu, v.1, p.171 - 188, 2018.

BADILLA, F. F.; ALVES, S. B. Controle do gorgulho da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) com *Beauveria* spp. em condições de

laboratório e campo. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v. 20, n. 1, p. 251-262, 1991.

BARBOSA, A. I. G.; REIS, C. H.; MENDONÇA, J. C.; LAMMLE, L. O uso de sensoriamento remoto para estimar área plantada de cana-de-açúcar em Campos do Goytacazes – RJ, Brasil. Revista Cerrados, v. 18, n. 2, p. 69-99, 2020.

BARRETO-TRIANA, N. C. Comportamento sexual e reprodutivo de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em Cana-de-açúcar. 95f. Tese (Doutorado em Ciências/Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2009.

BATISTA FILHO, A., ALVES, S.B., AUGUSTO, N.T., PEREIRA, R.M., ALVES, L.F.A. Stability and persistence of two formulations containing *Anticarsia gematalis* nuclear polyedrovirus (AgMNPV). Neotropical Entomology 30 (3): 411-416, 2001.

BEHIE, S.W.; JONES, S.J.; BIDOCHKA, M.J. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. Fungal Ecology, v. 13, p. 112-119, 2015.

BICH, G.A.; CASTRILLO, M.L.; KRAMER, F.L.; VILLALLBA, L.L.; ZAPAT, P.D. Morphological and molecular identification of entomopathogenic fungi from agricultural and forestry crops, Floresta e Ambiente 28, 1–11, 2021.

BROOME, J.R.; SIKOROWSKI, R.P.; NORMENT, B.R. A mechanism of pathogenicity of *Beauveria bassiana* on the larvae of the important fere ant, *Solenopsis richteri*. Journal of Invertebrate Pathology, v.28, p.87-91, 1976.

BUELL, C. B.; WESTON, W. H. Application of the mineral oil conservation method to maintaing collections of fungus culture. American Journal of Botany, v. 34, p. 555-561, 1947.

BUSTAMANTE, O. M.; LEIVA, S.; MENDOZA, J. E.; BOBADILLA, L.; ANGULO, G.; CALDERON, M. S. Phylogeny and species delimitations in the entomopathogenic genus *Beauveria* (Hypocreales, Ascomycota), including the description of *B. peruviansis* sp. nov. MycoKeys, v. 58, p. 47-68, 2019.

BUTT, T.M.; COATES, C.J; DUBOVSKIY, I.M.; RATCLIFFE, N.A. Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions. Adv. Genet, 94, 307-364, 2016.

CAMPOS, A.K.; MOTA, M.A.; ARAÚJO, J.V.; CECON, P. R. Atividade predatória, crescimento radial e esporulação e fungos predadores de nematóides *Monacrosporium* spp, submetidos à criopreservação. Ciênc Rural 24:465–469, 2004.

CASTELIANI, A., MARTINS, L. F., CARDOSO, J. F. M., SILVA, M. S. O., SILVA, R. S. A., CHACON-OROZCO, J. G., LEITE, L.G. Behavioral aspects of *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), damage to sugarcane and its naturais infection by *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Rhabditidae). Crop Protection 137: 105262, 2020.

CASTRO, T.; MAYERHOFER, J.; ENKERLI, J.; EILENBERG, J.; MEYLING, N. V.; MORAL, R. A.; DEMÉTRIO, C. G. B.; DELALIBERA, I. Persistence of Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. robertsii* in strawberry crop soil after soil drench application. *Agric. Ecosyst. Environ.* 233, 361–369, 2016.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA - CTC. Pragas e doenças da cana-de-açúcar. 2018.

CÍCERO, E.A.S.; FERRAUDO, A.S.; LEMOS, M.V.F.; 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.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, Brasília, DF, v. 11, n. 4, abril 2024.

COSTA, J. N. M.; SILVA, C. A.; TEIXEIRA, C. A. D.; SALLET, L. A. P.; ROCHA, R. B.; TELES, B. R. Isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-rizoma-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus*, Germar) (Coleoptera: Curculionidae). Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2010. 13p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Rondonia, 1677-8618 ; 68).

DEGASPARI, N.; BOTELHO, P. S. M.; ALMEIDA, L. C.; CASTILHO, H. J. Biologia de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Col.: Curculionidae), em dieta artificial e no campo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 22, n. 6, p. 553-558, 1987.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Ocorrência de *Sphenophorus levis* em 2000. *Stab – Açúcar, Álcool e Subprodutos*, v. 19, n. 1, p. 26, 2000.

DINARDO-MIRANDA, L. L. *Sphenophorus levis*. In: DINARDO-MIRANDA, L. L. *Nematoides e pragas da cana-de-açúcar*. 2 ed. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas. Cap. 7, p. 227-288, 2018.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V. Sugarcane straw and the populations of pests and nematodes. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 70, n. 5, p. 305-310, 2013.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V.; CABRAL, S. B.; VALÉRIO, W.; GONÇALVES, R. D.; BELTRAME, J. A. Eficiência de inseticidas aplicados em soqueiras de cana-de-açúcar no controle de *Sphenophorus levis*. *STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos*, Piracicaba, v. 24, n. 5, p. 34-37, maio/jun. 2006.

DOMINGUES, M. M.; SANTOS, P. L.; GÊA, B. C. C.; CARVALHO, V. R.; OLIVEIRA, F. N.; SOLIMAN, E. P.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C.; ZANETTI, R.; WILCKEN, C. F. Entomopathogenic fungi, isolated from soils and *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) adults, to manage the eucalyptus red gum lerp psyllid *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae). *Journal of Economic Entomology*, 115, 1886–1893, 2022.

DONINI, L. P.; FERREIRA MOURA, I.; GUISSO, A.P.; SOUZA, J. A.; VIÉGAS, J. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes

concentrações de hipoclorito de sódio. Arquivos do Instituto de Biologia, vol. 72, n. 4, p. 517-522, 2005.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research, Oxford, v. 32, p. 1792-1797, 2004.

EWING, B.; GREEN, P. Base calling of automated sequencer traces using PHRED. II. Error probabilities. Genome Research, New York, v. 8, p. 186–94, 1998.

FAO. Sugar crops and climate change: towards the adaptation of sugar crops in the context of climate change. Rome: FAO, 2020.

FERREIRA, P. H. U.; FERREIRA, M. C.; VIEIRA, E. Improving *Sphenophorus levis* Adult Mortality Through Solid Insecticide Applications and Increased Insecticide Dose. Neotropical Entomology, v. 53, p. 1293-1308. 2024.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. World production of major agricultural crops in 2024. Rome: FAO, 2024. Disponível em: <https://www.fao.org>.

FRANCO, H.C.J.; OTTO, R.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; de OLIVEIRA, E.C.A.; Trivelin P.C.O. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. Field Crops Research, v. 121, p. 29-41, 2011.

GABRIEL FILHO, L. R. A.; AMORIM, F. R.; CREMASCO, C. P.; PRESUMIDO JÚNIOR, M.; OLIVEIRA, S. C. Estimating sugarcane productivity: an approach using fuzzy logic. Revista Ciência Agronômica, v. 55, e20228392, 2024.

GARCIA, J. F.; BOTELHO, P. S. M. Cana-de-açúcar: Desafios fitossanitários e manejo sustentável. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda, CRIAR/Boletim Técnico, n. 4, p. 65-76, 2016.

GARCÍA, J. L.; SOTELO, P.; MONROY, D. M. et al. Identification and characterization of a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolate having a high potential for the control of the *Diatraea* sp. sugarcane stem borer. Biotecnología Aplicada, v. 35, n. 1, p. 1201-1207, 2018.

GIOMETTI, F. H. C.; WENZEL, I. M.; ALMEIDA, J. E. M. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Biológico, São Paulo, v. 68, Suplemento, p. 550-552, 2006.

GIOMETTI, F.H.C.; WENZEL, I.M.I.; ALMEIDA, J.E.M.; LEITE, L.G.; ZAPPELINI, L.O. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle de adultos do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.77, n.1, p.167-169, 2010.

GIRÓN-PÉREZ, K. et al. Atração de curculionídeos de *Sphenophorus levis* Vaurie (Coleoptera: Curculionidae) a fragmentos vegetais em diferentes estados de conservação. Neotropical Entomology, Londrina, v. 38, n. 2, p. 842-846, 2009.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, Toronto, v. 8, n. 3, p.195-202, 1998.

GREEN, P. PHRAD documentation, 1996. Disponível em: <<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>>. Acesso em: 04 agosto de 2024.

HAPSOH, D. S.; DINI I. R. Isolation *Beauveria bassiana* Vuill. Entomopathogen local from plant agriculture rhizosphere in Riau Province Indonesia with insect bait *Tenebrio Molitor* Larvae. *Journal of Physics*, v: 1655, p. 1-6, 2020.

HAWKINS, N. J.; BASS, C.; DIXON, A.; NEVE, P. The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biological Reviews*, v. 94, p. 135-175, 2018.

INGLIS, D. G.; ENKERLI, J.; GOETTEL, M. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi. Hypocreales. In: Lacey L (ed) *Manual of techniques in invertebrate pathology*, 2nd edn. Academic Press, Boston, pp 189–253, 2012.

KHAN, S.; GUO, L.; MAIMAITI, Y.; MIJIT, M.; QIU, D. Entomopathogenic Fungi as Microbial Biocontrol Agent, *Molecular Plant Breeding*, Vol.3, No.7 63-79, 2012.

LEITE, L. G. et al. Alternativa de controle. *Cultivar Grandes Culturas*, Pelotas, v. 83, p.30- 33, 2006.

LIMA, E. A. L. A. Aspectos taxonômicos e citológicos de *Hyphomycetes* (Deuteromycotina) entomopatogênicos. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*. v. 84, supl.3, p.17-20, 1989.

LOPES, C. M. D. A. Biologia, comportamento e flutuação populacional da broca-do-fruto do cupuaçuzeiro *Conotrachelus* sp. (Coleoptera: Curculionidae). 2000. 90 f. Tese (Tese de Doutorado)-Universidade do Amazonas, Manaus, 2000.

LUNA ALVES-LIMA E.A.; TIGANO M.S. Citologia de estruturas leveduriformes de *Beauveria bassiana* em meios de cultura líquidos e na hemolinfa de *Spodoptera frugiperda*. *Revista de Microbiologia*, v.20, p.85-94, 1989.

MACEDO, N.; SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. Manejo de Pragas e Nematoides (Ed.). In: *Cana-de-açúcar: Bioenergia, Açúcar e Álcool - Tecnologia e Perspectivas*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 119-159, 2010.

MCCOY, C. W.; SAMSON, R. A.; BOUCIAS, D. G. Entomogenous fungi. In: IGNOFFO, C. M. (ed.) *Handbook of Natural Pesticides*. v. V. CRC Press, p. 151-237, 1988.

MEENA, B. S.; RAM, B.; NAROLIA, R. D S.; SINGH, P. Yield, quality, nutrient uptake and economics of spring sugarcane (*Saccharum officinarum*) as influenced by balanced fertilization in clay loam soils of Rajasthan. *Indian Journal of Agronomy*, v. 60, n. 3, p. 457-463, Sept. 2015.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Registro e Pós-registro de produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica. Publicado em 21 dez. 2016. Atualizado em 30 set. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/produtosfitossanitarios/ProdutosFitossanitarioscomusoAprovadoparaaAgriculturaOrganicaRegistradosatualizadoem310521.pdf>. Acesso em: 18 out. 2024.

OLIVEIRA M.T.; MONTEIRO A.C.; LA SCALA JUNIOR N.; BARBOSA J.C.; MOCHI D.A. Sensibilidade de isolados de fungos enteropatogênicos às radiações solares, ultravioleta e à temperatura. Arquivos do Instituto Biológico 83: 1-7, 2016.

OLIVEIRA FILHO, F. X.; MIRANDA, N. O.; MEDEIROS, J. F.; SILVA, P. C. M.; MESQUITA, F. O.; COSTA, T. K. G. Compactação de solo cultivado com cana-de-açúcar em Baía Formosa, Rio Grande do Norte. Revista Ceres, 63(5), 715–723, 2016.

PAGLIARANI, V. D. Formulação e dose do fungo *Beauveria bassiana* no controle de *Sphenophorus levis* e efeito em pragas de solo em cana-de-açúcar. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso - Centro Universitário Moura Lacerda, Ribeirão Preto, 2012.

PINTO, A. S.; BOTELHO, P. S. M.; DE OLIVEIRA, H. N. Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos da cana-de-açúcar. Piracicaba: CP2, 2009. 108 p.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike Information Criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. Systematic Biology, Oxford, v. 53, n. 5, p. 793-808, 2004.

PRECETTI A. A. C. M.; TERAN, F. O. Gorgulhos da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978, e *Metamasius hemipterus* (L., 1765) (Col., Curculionidae). In: COPERSUCAR: Reunião Técnica Agrônômica: Pragas da Cana-de-açúcar. São Paulo.p. 32-37, 1983.

PRECETTI, A. A. C. M.; ARRIGONI, E. B. Aspectos biológicos e controle do besouro *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar. Boletim Técnico Coopersucar – Edição Especial, 1990. 15 p.

REHNER, S. A. Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*. In: Vega, F.E.; BLACKWELL, M. Insect-fungal Association Ecology and Evolution. New York: Oxford University Press, 2005.

REHNER, S. A.; MINNIS, A. M.; SUNG, G.H.; LUANGSA-ARD, J. J.; DEVOTTO, L.; HUMBER, R. A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. Mycologia 103:1055–1073, 2011.

RESENDE, M. L.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M.; PINHO, R. G. V.; VIEIRA, A. R. Inoculações de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. Ciência e Agrotecnologia, 28, 4: 793-798, 2004.

RODRIGUES, C. J. B. et al. Estudo morfológico de isolados de *Beauveria bassiana* antes e após reisolamento em *Rhipicephalus microplus*. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 91-97, 2016.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

SANDRI, M. R.; CAVIÃO, H. C.; OLIVEIRA, C. F.; ANDRADE, L. B.; GRANADA, C.; SCHWAMBACH, J. The plant growth effect and biocontrol potential of *Trichoderma* sp. inoculation in tomatoes are dependent of the inoculation way. Bragantia, 83, e20230075, 2004.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria Geral Parlamentar. Departamento de Documentação e Informação. Lei nº 11.241, de 19 de setembro de 2002. Diário Oficial do Estado de São Paulo. 2002.

SCOPINHO, R. A.; EID, F.; VIAN, C. E. F.; SILVA, P. R. C. Novas tecnologias e saúde do trabalhador: a mecanização do corte da cana-de-açúcar. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 147-162, 1999.

SILVEIRA, L.C.I. da; KIST, V.; PAULA, T.O.M. de; BARBOSA, M.H.P.; OLIVEIRA, R.A. de; DAROS, E. Adaptabilidade e estabilidade fenotípica de genótipos de cana-de-açúcar no Estado de Minas Gerais. Ciência Rural, v.42, p.587- 593, 2012.

SIMI, L. D. Controle de *Sphenophorus levis* e *Conotrachelus humeropictus* pelo uso combinado de nematoides e fungos entomopatogênicos. 121 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Proteção de Plantas) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Botucatu, 2014.

SOLANO-GONZÁLEZ, S.; CASTRO-VÁSQUEZ, R.; MOLINA-BRAVO, R. Genomic Characterization and Functional Description of *Beauveria bassiana* Isolates from Latin America. Journal of Fungi, v. 9, n. 7, p. 711, 2023.

SOUZA, A.. *Phyllosticta citricarpa*: diversidade genética temporal em pomares de *Citrus sinensis* e sensibilidade a fungicidas. 2015. 74 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2015.

SOUZA, D. A.; LOPES, R. B.; HUMBER, R.; FARIA, M. Assessment of the diversity of Brazilian entomopathogenic fungi in the genus *Beauveria*. Journal of Invertebrate Pathology, v. 171, 107339, 2020.

TAMAI, M. A.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; FAION, M.; PADULLA, L. F. L. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 69, 2002.

TORQUATO, S. A. Mecanização da colheita de cana-de-açúcar: benefícios ambientais e impactos na mudança do emprego no campo em São Paulo, Brasil. Rev. Bras. Ciências Ambientais, v. NI, n. 29, p. 49-62, set. 2013.

VIDAL, M. F. Agroindústria: Açúcar. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, ano 8, n.290, jul. 2023. (Caderno Setorial Etene).

VINHA, F. B.; DELFANTI, L. A. de A.; PAGLIARANI, V. D.; FERREIRA, V. S.; PINTO, A. de S. Entomopathogenic fungi on the control of *Sphenophorus levis* in sugarcane crop. Scientia Agraria Paranaensis, v. 19, p. 280-288, 2020.

VUONG, P.; CHONG, S.; KAUR, P. The little things that matter: How bioprospecting microbial biodiversity can build towards the realization of United Nations Sustainable Development Goals. NPJ Biodiversity, v. 1, p. 4-5, 2022.

XAVIER, G.G.; de SÁ FARIAS, E.; do CARMO D. D. G.; et al. Determining Factors and Economic Injury Levels for *Sphenophorus levis* for Chemical and Biological Control in Irrigated and Non-irrigated Sugarcane Crops. Neotropical Entomology. 2024. Aug;53(4):955-963.

ZHANG, B. X.; LIU, F. F.; LIU, F.; QI, W. X.; SI, Y. Q.; REN, H. Y.; ZHANG, C. Q.; RAO, X. J. The fungal protease BbAorsin contributes to growth, conidiation, germination, virulence, and antiphytopathogenic activities in *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae). Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 202, 2024.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol Science and Technology, v. 17, n. 6, p. 553-596, 2007.

ZINGER, F. D.; ZINGER, L. K. C. R., MOAES, W. B.; CAMARA, G. D. R.; ALVES, F. R. Quantification of damage and yield losses and management of root-knot nematodes in conilon coffee. Rev. Caatinga 34, 287–297, 2021.