

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

***Beauveria bassiana* VIA ENDOFÍTICA VISANDO AO
CONTROLE DE *Sphenophorus levis* VAURIE, 1978
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

**Juliana Silva Queiroz
Engenheira Agrônoma**

2024

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

***Beauveria bassiana* VIA ENDOFÍTICA VISANDO AO
CONTROLE DE *Sphenophorus levis* VAURIE, 1978
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

Discente: Juliana Silva Queiroz

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk

Coorientador: Prof. Dr. Sergio Antonio De Bortoli

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

Q3b

Queiroz, Juliana Silva

Beauveria bassiana via endofítica visando ao controle de
Sphenophorus levis Vaurie, 1978 (Coleoptera:Curculionidae) /
Juliana Silva Queiroz. -- Jaboticabal, 2024

51 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Ricardo Antônio Polanczyk

Coorientador: Sergio Antonio De Bortoli

1. Entomologia. 2. Controle biológico. 3. Sphenophorus levis.
4. Fungo Beauveria bassiana. 5. Fungo endofítico. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal




CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: *Beauveria bassiana* VIA ENDOFÍTICA VISANDO AO CONTROLE DE *Sphenophorus levis* VAURIE, 1978 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)


AUTORA: JULIANA SILVA QUEIROZ
ORIENTADOR: RICARDO ANTONIO POLANCZYK
COORIENTADOR: SERGIO ANTONIO DE BORTOLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Agronomia (Entomologia Agrícola), pela Comissão Examinadora:


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

Documento assinado digitalmente
 **SERGIO ANTONIO DE BORTOLI**
 Data: 29/05/2024 16:22:38-0300
 Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Prof. Dr. ALEXANDRE DE SENE PINTO (Participação Virtual)
 Departamento de Ciências Agrárias / Centro Universitário Moura Lacerda - Ribeirão Preto/SP


Documento assinado digitalmente
 **ALEXANDRE DE SENE PINTO**
 Data: 30/05/2024 21:44:38-0300
 Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Prof. Dr. DIEGO FELISBINO FRAGA (Participação Virtual)
 Faculdades Associadas de Uberaba / Uberaba/MG

Documento assinado digitalmente
 **DIEGO FELISBINO FRAGA**
 Data: 31/05/2024 09:56:43-0300
 Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

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

Pesquisador Dr. RAFAEL MAJOR PITTA (Participação Virtual)
 Embrapa Agrosilvipastoral / Sinop/MT

Documento assinado digitalmente
 **RAFAEL MAJOR PITTA**
 Data: 31/05/2024 15:09:19-0300
 Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Jaboticabal, 29 de maio de 2024

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Juliana Silva Queiroz – nascida em 11 de outubro de 1979, na cidade de Remanso - Bahia, filha de Luiz Alvez Queiroz e Cordélia Silva Queiroz. Formada em Agronomia pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) em 2005, Cruz das Almas, Bahia. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica do CNPq na Embrapa Mandioca e Fruticultura por três anos, desenvolvendo trabalhos na área de irrigação e fertirrigação em fruteiras sob a orientação do Dr. Eugênio Ferreira Coelho. Graduada foi Fiscal Agropecuária do Estado da Bahia (ADAB), no período de 2006 a 2009, atuando na fiscalização de produtos de origem vegetal, agrotóxicos e afins e monitoramento de pragas quarentenárias no Estado da Bahia. Foi professora do Curso Técnico em Agropecuária na Casa Familiar Rural de Presidente Tancredo Neves - BA (CFR-PTN), projeto social da Odebrecht, entre 2010 e 2011, onde desempenhou docência em nível técnico e incentivo ao protagonismo de jovens produtores rurais na permanência no campo. Foi Coordenadora de Projetos Agroecológicos para produtores rurais no Baixo Sul da Bahia pela FASE (Federação de Órgãos para Assistência Social e Educacional) no período de 2011 a 2013. Em 2015, ingressou no Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária na qual foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Bahia (FAPESB), sob orientação da Dra. Marilene Fancelli, onde desenvolveu pesquisa na EMBRAPA Mandioca e Fruticultura com estudos sobre otimização do processo de monitoramento da principal praga da bananeira, *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae). Em 2019, ingressou no curso de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola), em nível de Doutorado, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, trabalhando na linha de pesquisa de Controle Biológico de Insetos Pragas com Entomopatógenos.

“Muitos outonos foram meus. Uns de brisa leve, que só balançaram meus anseios. Outros ventaram forte e quase derrubaram meus sonhos. Agora esse meu novo outono trouxe consigo uma aragem íntima. Chove nas minhas raízes e floresce cheio de boas novas. A cada estação replanto-me. Assim, mais fortes ficam minhas folhas. Eu sei que cairão, mas não, sem antes mostrar que lutaram.”

(Rô Mendes)

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz Alvez Queiroz e Cordélia Silva Queiroz, e à minha amiga e orientadora de Mestrado, Dra. Marilene Fancelli, por acreditarem no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo amparo nos momentos difíceis, me dando força para superar as dificuldades, mostrando o caminho nas horas incertas.

Aos meus pais Luiz Alves Queiroz e Cordélia Silva Queiroz e irmãos por todo apoio, carinho, incentivo e compreensão durante os anos fora de casa.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Campus de Jaboticabal, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), e aos docentes e discentes do Programa de Pós-graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola), por todo suporte e apoio durante este trabalho, em especial, ao colega Joacir do Nascimento pelas orientações, paciência, amizade e ensinamentos das práticas de laboratório.

As amigas Ana Letícia Zero dos Santos, Raquel Oliveira Moreira e Hortência Kardec pelo apoio emocional e conselhos.

A amiga Sandy Sousa Fonseca, por ser meu “Norte”, por me ouvir, por me orientar e ser meu ombro amigo nos inúmeros momentos difíceis vividos na pós-graduação.

A minha eterna orientadora, que eu tive a sorte de ter no mestrado, exemplo de profissionalismo, de orientação e principalmente excelente pesquisadora, Dra. Marilene Fancelli.

Ao meu Coorientador Dr. Sergio Antonio de Bortoli que nos últimos momentos, orientou minha defesa e contribuiu no auxílio do documento final.

A toda equipe de coleta e estudo em *Sphenophorus levis*, representada por João Rafael Silva Soares e Dagmara Gomes Ramalho.

Ao Dr. Ciro Pedro Guidotti Pinto pelas contribuições estatísticas do trabalho.

Aos Professores Doutores Guilherme Duarte Rossi, Daniel Junior de Andrade e Odair Aparecido Fernandes pelo apoio para finalização do meu Doutorado.

A todos os funcionários do Departamento de Ciências da Produção Agrícola, Setor de Fitossanidade da FCAV, pelo convívio diário, auxílio e companheirismo.

Este trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. A cultura cana-de-açúcar.....	2
2.2. Manejo integrado de pragas na cana-de-açúcar.....	4
2.3. <i>Sphenophorus levis</i>	6
2.4. Controle.....	8
2.5. <i>Beauveria bassiana</i>	10
2.6. <i>Beauveria bassiana</i> como fungo endofítico.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Estabelecimento da criação de <i>Sphenophorus levis</i>	17
3.2. Estimativa da concentração letal média (CL ₅₀) de <i>Beauveria bassiana</i> para larva de <i>Sphenophorus levis</i>	20
3.2.1. Preparo dos isolado fúngicos para realização dos bioensaios.....	20
3.2.2. Bioensaio de mortalidade.....	21
3.3. Bioensaios com <i>Beauveria bassiana</i> endofítica na alteração do comportamento de <i>Sphenophorus levis</i> na busca pela planta e redução do dano larval em cana-de-açúcar.....	24
3.3.1. Preparo do inóculo.....	24
3.3.2. Tratamento das plantas.....	25
3.3.3. Confirmação da colonização endofítica.....	26
3.3.4. Efeito da colonização endofítica por <i>Beauveria bassiana</i> sobre a atratividade de cana-de-açúcar a adultos de <i>Sphenophorus levis</i>	26
3.3.4.1. Bioensaios de atração com olfatômetro.....	26
3.3.5. Efeito da colonização endofítica por <i>Beauveria bassiana</i> sobre os danos larvais de <i>Sphenophorus levis</i> em cana-de-açúcar.....	28
3.3.5.1. Obtenção das plantas.....	28
3.3.5.2. Infestação artificial com ovo e larva de <i>Sphenophorus levis</i>	28
3.3.5.3. Avaliação dos danos.....	29

3.4. Análises estatísticas.....	31
4. RESULTADOS.....	31
4.1. Estimativa da Concentração Letal (CL ₅₀)	31
4.2. Confirmação da colonização endofítica	33
4.3. Avaliação comportamental do inseto aos voláteis das plantas	33
4.4. Dano larval de <i>Sphenophorus levis</i> em mudas de cana-de-açúcar submetidas à colonização endofítica por <i>Beauveria bassiana</i>	34
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÃO	39
7. REFERÊNCIAS.....	40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Instalação das Iscas confeccionadas com toletes na base de touceira de cana para a captura de adultos de *Sphenophorus levis*.....17
- Figura 2** - Criação *Sphenophorus levis* para obtenção de ovos e larvas. A - Cópula dos *S. levis* nas caixas; B - Troca dos colmos de cana-de-açúcar para alimentação dos insetos; C - Descasque da cana para retirada dos ovos, D - Postura endofítica dos ovos.....18
- Figura 3** - Manutenção das larvas de *Sphenophorus levis* em dieta artificial. A - Ovos *S. levis*; B - Larvas recém eclodidas; C - Coleta das larvas com auxílio de pincel; D - Inserção da larva na dieta artificial.....19
- Figura 4** - Desenvolvimento do *Sphenophorus levis* em dieta artificial. A e B - Larva de duas semanas; C - Pupa; e D - Adulto.....20
- Figura 5** - Preparação do teste de mortalidade para larvas de *Sphenophorus levis*. A - Corte da dieta; B - Pedaco acomodado no pote plástico; e C - Furo central para receber a larva trata.....23
- Figura 6** - Tratamento das larvas com inóculo. A - Aplicação da dose nas larvas; B - Larva tratada com fungo inserida na dieta artificial; C - Manutenção em ambiente escuro com temperatura e umidade controladas.....23
- Figura 7** - Confirmação da mortalidade da larva por *Beauveria bassiana* utilizando câmara úmida.....24
- Figura 8** - A - Preparo das mudas pré-brotadas (MPB) CTC 4 ; B - Inoculação com o fungo *Beauveria bassiana* na concentração de $1,6 \times 10^6$ conídios ML^{-1}26
- Figura 9** - Configuração do olfatômetro.....28
- Figura 10** - Infestação artificial. A – Perfuração com auxílio de uma furadeira elétrica; B – Disposição dos furos; C - Introdução do ovo; D - Introdução da larva retirada direto da dieta; E- Vedação com algodão parafina e fita plástica.....30
- Figura 11** - Avaliação do dano utilizando programa *ImageJ*[®]. A - Preparo da planta para fotografia; B - Cabine para captura das imagens; C - Imagem do colmo obtida para análise; D - Processamento da imagem.....31
- Figura 12** - Curva dose-resposta CL_{50} *Beauveria bassiana* em larva de *Sphenophorus levis* com coeficientes de dados de mortalidade transformados em percentual e a concentração dos esporos em log x.....32

Figura 13 - Confirmação endofítica de amostras de folha, colmo e raiz de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Beauveria bassiana</i> na concentração $1,6 \times 10^6$ conídios ML^{-1}	33
Figura 14 - A - Porcentagem de fêmeas de <i>Sphenophorus levis</i> repelidas pelas plantas de cana-de-açúcar submetidas a tratamento via solo com <i>Beauveria bassiana</i> ; B - Porcentagem do dano larval de <i>S. levis</i> na seção longitudinal de mudas de cana-de-açúcar submetidas ou não à colonização endofítica por <i>B. bassiana</i>	35
Figura 15 - Danos causados por larvas de <i>Sphenophorus levis</i> em plantas de cana-de-açúcar submetidas (A) ou não (B) à colonização endofítica por <i>Beauveria bassiana</i>	35
Figura 16 - Evidência da micose nas larvas de <i>Sphenophorus levis</i> causada por <i>Beauveria bassiana</i> inoculada via solo em plantas de cana-de-açúcar (D, E e F), em contraste com insetos sadios provenientes de plantas controle (A, B e C).....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dieta artificial para criação de <i>Sphenophorus levis</i> descrita por Degaspari (1987)	19
Tabela 2 - Doses de <i>Beauveria bassiana</i> utilizadas para a avaliação da toxicidade para larvas de <i>Sphenophorus levis</i>	21

***Beauveria bassiana* VIA ENDOFÍTICA VISANDO AO CONTROLE DE
Sphenophorus levis VAURIE, 1978 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

RESUMO - O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com tendência de aumento das áreas cultivadas em virtude da crescente demanda álcool como biocombustível, açúcar e subprodutos. Essa tendência traz consigo o aumento da infestação por pragas. *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae), conhecido vulgarmente como bicudo-da-cana, é importante praga de solo, limitante ao cultivo da cana-de-açúcar. Na fase larval, permanece internamente em estruturas da planta, consumindo os seus tecidos basais, e, por isso, é responsável por danos que causam perdas significativas e dificultando o seu controle. Estudos recentes têm demonstrado que *Beauveria bassiana* Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) pode colonizar plantas e protegê-las contra herbivoria causada por pragas. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial de colonização endofítica de *B. bassiana* em plantas de cana-de-açúcar e seu efeito sobre *S. levis*. Inicialmente, determinou-se a concentração letal CL₅₀ de *B. bassiana* cepa IBCB 66 para larvas de *S. levis*, chegando ao resultado de $1,6 \times 10^6$ conídios ML⁻¹. Suspensão de *B. bassiana* nessa concentração foi inoculada em solo em sessenta plantas de cana-de-açúcar da variedade CTC4, sendo confirmada a colonização pelo fungo nas plantas mediante a técnica de postulado de Koch de reisolamento por meio seletivo de amostras de folhas, colmos e raízes. Adultos *S. levis* foram avaliados por meio de olfátometro para verificar se a colonização das plantas cana-de-açúcar pelo fungo *B. bassiana* altera o comportamento dos insetos na busca pelos hospedeiros. Os resultados demonstraram que a colonização afetou o comportamento dos insetos na busca por plantas inoculadas, resultando em uma preferência de 69,8% por aquelas não inoculadas. Outro experimento foi realizado para verificar se a colonização do fungo nas plantas afetaria os danos provocados pelas larvas de *S. levis*. Nesse sentido 210 plantas, foram utilizadas, sendo inoculadas com o fungo da mesma forma do experimento anterior, assim como o controle e infestadas artificialmente com ovos e larvas de *S. levis* passando por um período de 30 dias, passado o período as plantas foram abertas, fotografadas e analisadas por meio do software *image j*®, resultando na redução dos danos larvais na ordem de 38,0%. O estudo demonstrou pela primeira vez que o fungo *B. bassiana* aplicado ao solo pode proteger plantas de cana-de-açúcar contra *S. levis*, prejudicando o desenvolvimento larval, sugerindo um novo mecanismo para utilização do agente de biocontrole *B. bassiana* para *S. levis*.

“Palavras-chave:” Bicudo-da-cana, fungo endofítico, proteção de plantas.

***Beauveria bassiana* ENDOPHYTIC PATHWAY TO CONTROL *SPHENOPHORUS LEVIS* VAURIE, 1978 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

ABSTRACT – Brazil is the largest producer of sugar cane in the world, with a tendency to increase cultivated areas due to the growing demand for alcohol as a biofuel, sugar products and by-products. This trend brings with it an increase in pest infestation. *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae), commonly known as the sugarcane weevil, is an important soil pest that limits sugarcane cultivation. In the larval stage, it remains inside the plant's structures, consuming its basal tissues, and is therefore responsible for damage that causes significant losses and makes it difficult to control. Recent studies have shown that *Beauveria bassiana* Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) can colonize plants and protect them from herbivory by pests. The aim of this study was to evaluate the potential for endophytic colonization of *B. bassiana* in sugarcane plants and its effect on *S. levis*. Initially, the CL50 lethal concentration of *B. bassiana* strain IBCB 66 was determined for *S. levis* larvae, arriving at a result of 1.6×10^6 ML⁻¹ conidia. A suspension of *B. bassiana* at this concentration was inoculated into the soil of sixty sugarcane plants of the CTC4 variety, and colonization by the fungus in the plants was confirmed using the Koch's postulate technique of selective re-isolation of samples of leaves, stalks and roots. After inoculation, *S. levis* adults were evaluated using an olfactometer to see if the colonization of sugarcane plants by the *B. bassiana* fungus altered the insects' host-seeking behaviour. The results showed that colonization affected the insects' search behavior for inoculated plants, resulting in a 69.8% preference for non-inoculated plants. Another experiment was carried out to see if the colonization of the fungus on the plants would affect the damage caused by the *S. levis* larvae. The plants were inoculated with the fungus in the same way as the previous experiment, as well as the control, being artificially infested with eggs and larvae of *S. levis* for a period of 30 days, then these plants were opened, photographed and analyzed using *image j*® software. The fungus resulted in a 38.0% reduction in larval damage and negatively affecting the insect's larvae. The study demonstrated for the first time that the fungus *B. bassiana* applied to the soil can protect sugarcane plants against *S. levis*, damaging larval development, suggesting a new mechanism for using the biocontrol agent *B. bassiana* for *S. levis*.

“Keywords”: Sugarcane weevil, endophytic fungus, plant protection.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar, *Saccharum* spp. (Poales: Poaceae), é uma cultura importante para o Brasil, considerado maior produtor mundial, sendo o Estado de São Paulo o maior produtor com mais de 212,5 mil hectares de área plantada. A importância do cultivo se deve em grande parte ao fato de ser base da produção do açúcar e etanol, além de uma diversidade de produtos secundários, constituindo-se em importante matéria prima para biocombustíveis obtidos de fontes renováveis (CONAB, 2023; UDOP, 2023).

Investimentos no setor geram a necessidade de aumento das áreas de produção elevando os riscos da ocorrência de pragas. Dentre as inúmeras espécies de artrópodes que ocorrem na cultura da cana-de-açúcar, destaca-se *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae), importante praga de solo, limitante para a cultura, apresentando grande potencial de danos e perdas que têm variado de 20 a 30 toneladas por ano (Xavier, 2020).

Os danos causados pelo inseto são atribuídos apenas à fase larval que se desenvolve no interior dos entrenós basais das plantas, abrindo galerias que obstruem o fluxo de seiva e impedem a emissão de novos perfilhos. Como consequências das infestações pela praga são relatadas falhas nas brotações das soqueiras e queda significativa na produtividade (Degaspari *et al.*, 1987; Pinto *et al.*, 2006).

Além disso, os estágios imaturos do inseto, (ovo, larva e pupa), por se encontrarem protegidos internamente na planta, são facilmente dispersados através de mudas infestadas, aumentando a incidência da praga nas áreas de cultivo (Precetti e Arrigoni, 1990; Rosa *et al.*, 2024). O controle do inseto representa um grande desafio, uma vez que os métodos empregados são considerados ineficazes e não conseguem conter o avanço populacional da praga, necessitando de abordagens mais seletivas com ações diretas sobre a fase larval (Precetti e Arrigoni, 1990).

O uso de entomopatógenos tem apresentado bons resultados como alternativa eficaz na redução populacional de insetos-praga, com menor impacto ambiental e seletividade aos inimigos naturais (Globe *et al.*, 2017). Entre os agentes de controle microbiano, o fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 (Hypocreales: Cordycipitaceae) tem se destacado no controle de *S. levis* (Vinha *et al.*, 2020; Pereira

e Santos, 2022), porém sua eficiência é significativamente influenciada por fatores abióticos como temperatura, umidade e radiação solar (Mann e Davis, 2020; Zaman *et al.*, 2020).

Estudos recentes revelam que *B. bassiana* tem desempenhado papéis adicionais na natureza, incluindo o “endofitismo”, comportamento já constatado em várias espécies de plantas cultivadas e de importância agrícola (Qin *et al.*, 2021; Altaf *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2023), inclusive em cana-de-açúcar (Donga *et al.*, 2018; Kasambala Donga *et al.*, 2021). Esse comportamento pode ser explorado como estratégia de manejo integrado de pragas (MIP) (Vega *et al.*, 2009; Quesada Moraga, 2020), podendo proporcionar várias vantagens às plantas hospedeira, inclusive, atuando como indutor de resistência a pragas e patógenos, aumentando também a tolerância aos estresses bióticos e abióticos (Bharadwaj, 2024; Darsouei *et al.*, 2024).

A ação endofítica e sistêmica de *B. bassiana* na proteção de plantas contra pragas, especialmente insetos que apresentam estágios larvais endofíticos, cujo ciclo de vida limita a ação do controle, pode agregar como uma nova abordagem do uso desses entomopatógenos (Agbessenou *et al.*, 2020; Quesada Moraga, 2020). Nesse sentido, considerando a importância de *S. levis* e a colonização de *B. bassiana* em plantas de cana-de-açúcar, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dessa colonização endofítica em *S. levis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar tem sua importância marcada desde o descobrimento do Brasil, como primeira cultura explorada economicamente, sendo introduzida de Portugal como estratégia de ocupação territorial, encontrando aqui condições favoráveis para seu desenvolvimento (Antunes *et al.*, 2019). Desde então ocupa lugar de destaque, com o Brasil se tornando o maior produtor mundial, gerando faturamento de mais de US\$ 20 bilhões/ano, valor este que corresponde a aproximadamente 2% do produto interno bruto (PIB) (FAO, 2023; UDOP, 2023).

A importância da cultura tem incentivado o aumento da produção, estimulado também pelas preocupações internacionais sobre políticas de redução de emissões de gases de efeito estufa, além da necessidade de se buscar formas economicamente

viáveis de produção de biocombustíveis sustentáveis e de seus subprodutos. Essas preocupações têm impulsionado a efetivação de acordos ambientais (Vandenberghe *et al.*, 2022).

As grandes áreas com cultivo de cana-de-açúcar estão concentradas especialmente na região Sudeste, tendo como principal produtor o Estado de São Paulo, com área de aproximadamente 10 milhões de hectares e com forte tendência de aumento até 2030 (CONAB, 2023; IBGE, 2023).

A cana-de-açúcar é uma gramínea semi-perene cultivada como híbrido interespecífico, tendo metabolismo fotossintético C4, o que proporciona à planta alta capacidade de conversão de energia solar em biomassa, garantindo o armazenamento da sacarose nos tecidos, sendo de grande importância comercial (Silva *et al.*, 2018; Lacerda *et al.*, 2019). A parte aérea é formada por colmos, caule típico das gramíneas, folhas e inflorescências, enquanto a parte subterrânea é constituída pelas raízes (tipo fasciculada) e o caule subterrâneo, espesso e rico em reserva nutritiva, provido de nós e entrenós que crescem horizontalmente, formando touceiras que garantem o ciclo reprodutivo da planta (Moore e Botha, 2013; Zhang *et al.*, 2015).

A cultura apresenta o ciclo que pode variar de 4 a 6 anos, podendo chegar a dez cortes sem a necessidade de renovação do canavial. Essa longevidade é regulada por diversos fatores como variedade, fertilidade do solo, condição climática, práticas culturais e, principalmente, a ocorrência de doenças e de pragas (Li, 2023).

A alteração do processo de colheita da cana-de-açúcar, motivada em 2002 no Estado de São Paulo pela legislação ambiental Nº 11.241 que proibiu a queima pré-colheita, proporcionou inúmeros benefícios agronômicos e ambientais. Dentre esses benefícios pode-se citar o incremento das populações de insetos benéficos como parasitoides, predadores e saprófagos, que prestam importantes serviços ecológicos como agentes de mortalidade biótica de pragas da cana-de-açúcar (Marques *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2021).

A presença da palha na superfície do solo afetou significativamente as populações de pragas de solo, alterando o “status” desses organismos que têm como

principal alvo o sistema radicular, causando perdas importantes, com significativas quedas de produtividade (Castro *et al.*, 2019; Carbonari *et al.*, 2020).

Insetos de solo são geralmente considerados pragas importantes devido à dificuldade de visualização, pois normalmente estão localizados nas touceiras, enquanto as fases jovens muitas vezes são endofíticas. Existe dificuldade em se estudar o comportamento e a biologia desses insetos, sendo este o principal obstáculo para o desenvolvimento de ações de controle, exigindo estratégias integradas que possibilitem a manutenção das interações tróficas e seletivas aos inimigos naturais (Dinardo-Miranda, 2008; Carbonari *et al.*, 2020).

2.2. Manejo integrado de pragas na cana-de-açúcar

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) é a melhor opção para os sistemas canavieiros, pois se baseia em abordagem que integra técnicas diversificadas e complementares que visam manter as populações de pragas abaixo do nível de dano econômico, o que difere das estratégias tradicionais, individuais e centradas nas pragas, que dependem fortemente dos produtos químicos (inseticidas). O MIP adota uma abordagem holística, considerando o sistema de produção como um todo, priorizando o controle natural de populações de pragas, possibilitando a manutenção de insetos benéficos, seguindo princípios econômicos, ecológicos e sociais (Parra, 2014).

As pragas de solo na cultura da cana-de-açúcar são predominantes e causam grandes impactos, o que dificulta o manejo. Por isso, a incorporação do MIP ao sistema de produção da cana-de-açúcar, com uso de técnicas culturais, varietais, biológicas e químicas, tem sido crescente, e com significativo apoio das pesquisas, gerando informações sobre a biologia e taxonomia das principais pragas, o que fortalece e orienta o controle desses agentes. Dentre as estratégias já consolidadas, o controle com espécies macro (parasitoides e predadores) e microbiológicas (entomopatógenos) vêm tendo papel preponderante no controle de pragas (Parra e Coelho Júnior, 2022).

Na cultura da cana-de-açúcar ocorreu o pioneirismo na adoção de dois dos maiores programas de controle biológico no Brasil, o da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) com os parasitoides

Cotesia flavipes Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae) e *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Parra, 2014). Esses programas tiveram grande impacto na redução das populações da praga, que apresentavam altos níveis de infestação em 1970, causando perdas de cerca de US\$ 100 milhões somente no Estado de São Paulo. A solução teve seu início com a importação e o estabelecimento de laboratórios de criação (biofábricas) de *C. flavipes* para controlar lagartas de *D. saccharalis* no Sudeste do Brasil (Parra e Coelho Júnior, 2019; Parra, 2023). Esse programa de controle biológico aplicado reduziu significativamente os níveis de infestação da praga. Atualmente, existem aproximadamente sessenta biofábricas no Brasil e até dois bilhões de parasitoides são liberados a cada ano, com os parasitoides liberados (à taxa de 6.000/ha) quando a população da broca da cana atinge de 3,0% a 4,0% de infestação, sendo que atualmente a infestação média da broca da cana gira em torno de 2% (Bueno *et al.*, 2020).

Outro sucesso do controle biológico diz respeito ao da cigarrinha *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) empregando o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff, 1879) Sorokin, 1883 (Hypocreales: Clavicipitaceae), que resultou na redução dos níveis de infestação, com esse entomopatógeno utilizado como substitutivo aos inseticidas químicos (Mascarin *et al.*, 2019).

Os agentes biológicos de controle têm sido utilizados em cerca de 50% das áreas plantadas com cana-de-açúcar no Brasil (Parra e Coelho Júnior, 2019; Sharma *et al.*, 2020), estimulando pesquisas e o desenvolvimento de empresas e biofábricas, sendo a cultura da cana-de-açúcar, juntamente com a da soja, responsáveis por mais de 60% do mercado de biológicos no Brasil, levando o setor de pesquisa a investir em novas técnicas de produção e formulações (Shahid *et al.*, 2023; Verma *et al.*, 2024).

O controle biológico na cana-de-açúcar vem ganhando outros aliados importantes tais como a agricultura de precisão, inteligência artificial, sensoriamento remoto e drones, que juntos auxiliam na otimização das tomadas de decisões, em conjunto geram informações precisas, conectadas à gestão integrada dos processos de monitoramento e controle de pragas, reduzindo os custos, e permitindo melhor distribuição dos agentes de biocontrole otimização do processo de liberação (Almeida, 2019; Sanghera, 2021; Barbosa Júnior *et al.*, 2022).

2.3. *Sphenophorus levis*

Dentre os insetos de solo favorecidos pela mudança na colheita da cana (queimada para cana crua), destaca-se o bicudo-da-cana-de-açúcar, *S. levis*, principal praga para a cultura em algumas das áreas de cultivo no Brasil, o seu controle representa grande desafio devido ao comportamento da praga, além do grande potencial de dano e alta incidência nas principais áreas produtoras (Precetti e Arrigoni, 1990).

S. levis está presente em diversos continentes, atacando principalmente espécies de culturas pertencentes ao grupo das gramíneas (Poaceae). Foi relatado pela primeira vez no Brasil no Estado de São Paulo em 1977 e descrito como uma nova espécie em 1978 (Vaurie, 1978), estando distribuído nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina (Dinardo-Miranda, 2014) e Mato Grosso do Sul (Moraes e Ávila, 2014).

Os adultos de *S. levis* medem de 12,0 a 15,0 mm, possuem o rostro com aparelho bucal mastigador na extremidade, estrutura presente na família Curculionidae, o que lhe dá origem ao nome vulgar de bicudo-da-cana. O inseto pode ser facilmente confundido com outro Curculionidae muito comum nos canaviais, *Metamasius hemipterus* (L., 1758) (Coleoptera: Curculionidae), considerado praga secundária da cultura. No entanto, podem ser diferenciados pela coloração, onde *S. levis* é de castanho-escuro a marrom, com pronoto tendo três manchas negras longitudinais, irregulares e distribuídas por quase toda extensão da estrutura, enquanto o *M. hemipterus* apresenta coloração predominantemente castanho alaranjado, com os esternitos abdominais negros e manchas alaranjadas (Vaurie, 1978).

S. levis apresenta antena geniculo-clavada com margem basal convexa, sem proeminência em sua extensão; o abdômen tem cerdas e pequenas perfurações distribuídas em maior concentração nas delimitações dos esternitos e centro do pigídio. Apresenta dimorfismo sexual, sendo o macho menor que a fêmea. A região do pigídio nos machos é mais larga e arredondada, enquanto nas fêmeas é truncada e longa. Os machos apresentam cerdas na região ventral e nas coxas do primeiro par de pernas (Vaurie, 1978).

Outra característica desses coleópteros é apresentar o comportamento de tanatose, imobilidade tônica, em que o inseto se finge de morto ao ser tocado. São noturnos, fototropismo negativo, e higroscópicos, estando sempre abrigados em lugares úmidos do solo, em restos vegetais e entre os perfilhos na base da touceira das plantas. São gregários, com os machos produzindo feromônio de agregação para ambos os sexos (Wadt, 2016). Esse comportamento reflete diretamente na sintomatologia de ataque nas plantas, caracterizando os sintomas em “reboleira” (Degaspari *et al.*, 1987; Precetti e Arrigoni, 1990).

O clima exerce grande influência na flutuação populacional do inseto, sendo os adultos mais abundantes nos meses mais quentes e úmidos, enquanto as larvas predominam nos meses mais frios e secos. Contudo é possível observar a presença do inseto o ano todo atacando todas as fases de desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar (Alencar, 2016; Xavier, 2020).

O inseto apresenta baixa capacidade de dispersão, com seu deslocamento realizado basicamente por caminhamento, percorrendo 6,6 m a 11,1 m por mês, com voo restrito e pouco comum (Precetti e Arrigoni, 1990). Por isso, a dispersão de *S. levis* ocorre especialmente pelo transporte de mudas infestadas com presença de formas biológicas da praga (Dinardo-Miranda, 2000; Rosa *et al.*, 2024).

S. levis são holometabólicos passando pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto, variando seu desenvolvimento entre 58 e 307 dias. A fêmea pode viver em média de 174,9 dias, enquanto o macho 171,1 dias. Após a cópula, as fêmeas perfuram, com o auxílio do rostro, os tecidos saudáveis na base do colmo da planta de cana-de-açúcar, próximo do solo, e inserem o ovo individualmente no interior da planta. Cada fêmea ovíparos em média 40 ovos em que cerca de 70,0% deles colocados na primeira metade de sua longevidade (Precetti *et al.*, 1983; Degaspari *et al.*, 1987).

Os ovos possuem formato elíptico com tamanho médio de $0,270 \pm 0,004$ mm de comprimento e $0,100 \pm 0,012$ mm de largura, além de apresentar coloração branco-leitosa no momento da postura e amarelo-escuro próximo à eclosão. O período de incubação varia de 7 a 12 dias, com viabilidade média de 47,16% (Precetti e Arrigoni, 1990).

As larvas representam a forma biológica do inseto que causa danos, permanecendo por um período de 26 a 50 dias no interior da planta, consumindo o material basal do colmo, interrompendo o fluxo de seiva e impedindo a planta de perfilhar. Apresentam coloração branco leitosa, podendo evoluir para amarelo, sendo a cabeça de cor castanho-avermelhada; são ápodas e enrugadas; com mancha marrom no primeiro segmento torácico. Próximo da fase de pupa a larva amplia a galeria para formação da câmara pupal. O comportamento endófito das larvas é o grande desafio para o controle. As pupas são do tipo exarada e de cor amarelada, com período pupal de 5 a 13 dias (Degaspari *et al.*, 1987; Precetti e Arrigoni, 1990).

2.4. Controle

Para o controle de qualquer praga, o monitoramento para verificar o nível de infestação do inseto deve ser a primeira medida a ser tomada, sendo o alicerce para a tomada de decisão e direcionamento da melhor estratégia para o controle, uma vez que ele permite implementar efetivamente o manejo integrado de pragas (Vreysen, 2021).

A este respeito, o primeiro método de amostragem para *S. levis* foi proposto por Arrigoni (1988), que consiste na abertura de trincheiras de 50,0 cm de largura por 50,0 cm de comprimento e 30,0 cm de profundidade, em dois pontos por hectare, para inspeção da base da planta, avaliando-se os danos e a presença de estágios biológicos de insetos. Associado à avaliação de danos, recomendou-se que se efetuasse o monitoramento de adultos com isca feita a partir de um pedaço de colmo de 30,0 cm, cortado longitudinalmente, colocado próximo à base da touceira, com avaliação a cada 15 dias (Pavlu e Molin, 2016; Pavarini *et al.*, 2018; Mantovani, 2023).

Dada a dificuldade de amostragem da praga, tendo em vista as imensas áreas com cana-de-açúcar e a grande demanda por mão-de-obra, novos estudos vêm sendo apresentados como alternativas para melhorar o monitoramento com uso de ferramentas de geostatística, mapas de aplicação (SSA) e GIS, combinando com informações fornecidas por computadores e tecnologia via satélite apoiado em mapas de infestações e distribuição da praga (Noronha *et al.*, 2019; Castilho *et al.*, 2022).

Outra dificuldade para o manejo da praga ser bem-sucedido é a necessidade de conhecimento profundo sobre a biologia do inseto, com a dificuldade de

estabelecimento da criação de *S. levis* em laboratório ainda representando um desafio, tal fato implicou em abordagens normalmente ineficazes de controle, por serem baseadas apenas em históricos de infestações (Dinardo-Miranda, 2014).

A introdução de *S. levis* em novas áreas ocorre através de material de propagação infestado, resultando no aumento crescente das populações do inseto (Degaspari *et al.*, 1987). Diante disso, o uso preventivo de mudas saudáveis e livres de pragas deve fazer parte do plano de manejo de *S. levis*, uma vez que elas são importantes insumos na propagação, o que repercute na sua qualidade fitossanitária, merecendo grande atenção nos sistemas produtivos, considerando os reflexos negativos que a praga pode causar (Silva *et al.*, 2018; Andreato *et al.*, 2022).

A muda pré-brotada (MPB), proveniente de gemas individualizadas, é uma técnica desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Campinas que apresenta vantagens no aumento da eficiência de replantio em áreas de expansão e renovação quanto ao padrão de fitossanidade. Além disso, a técnica impede a propagação do *S. levis* em novas áreas (Santos *et al.*, 2020; Otto *et al.*, 2022).

O controle biológico tem papel importante no controle de *S. levis* e, integrado a outras técnicas de manejo, exibe ação seletiva com efeito direto sobre a fase praga. Nesse sentido, as pesquisas vêm avançando na prospecção de novas cepas de fungos enteropatogênicos (De Almeida, 2019; Vinha *et al.*, 2020), além de proteínas inseticidas *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillales: Bacillaceae) bactéria de solo que durante sua fase de esporulação é capaz de produzir cristais que são compostos por uma ou várias proteínas Cry chamadas de δ -endotoxinas, os quais conferem a ação tóxica nos insetos no estágio larva (Campanini *et al.*, 2012).

Outras técnicas de controle biológico como a utilização de nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* apresentam excelentes resultados para controle de *S. levis*, causando mortalidade acima de 70%, e com vantagem de aplicação no solo e ação direta sobre a fase crítica do inseto (Silva *et al.*, 2021). O modo de ação desses nematoides consiste na invasão de juvenis infectantes no corpo da praga e a liberação das bactérias patogênicas dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, alojadas no trato digestivo desses nematoides. No corpo da praga encontra ambiente favorável para multiplicação e liberação de toxinas que causam a morte rápida do hospedeiro (Leite *et al.*, 2023).

Por fim, os fungos entomopatogênicos também constituem em uma tática de controle bastante promissora e já empregada em programas de manejo de *S. levis*. Esses fungos superam outros inseticidas microbianos derivados de bactérias e vírus devido ao seu método de ação distinto e adequação para produção em larga escala, com vantagem de seletividade aos inimigos naturais. Em campo, *B. bassiana* destaca-se, podendo atingir reduções de até 80,0% nos danos causado por *S. levis* (Delfanti, 2012).

2.5. *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana foi o primeiro entomopatógeno a ser estudado com detalhes pelo entomologista italiano Agostino Bassi e o primeiro a ser utilizado no controle biológico de artrópodes, sendo o mais estudado (Deshmukh e Sandhu, 2024).

É uma espécie cosmopolita com ampla distribuição geográfica, encontrado em insetos infectados em áreas temperadas e tropicais em todo o mundo. No Brasil tem sido estudado sob diversas estratégias de controle, incluindo introdução inundativa. Apresenta como vantagens a seletividade aos organismos não-alvo, não desenvolvimento de resistência nos insetos, pois é organismo vivo com complexo mecanismo de ação, e ambientalmente seguro, sem ameaça à saúde humana, podendo ainda ser utilizado associado a outros métodos de controle, inclusive o químico (Sain *et al.*, 2019).

Os fungos são facilmente produzidos a um custo relativamente baixo, podendo ser utilizados em escala comercial, sendo encontrados diversos produtos comerciais para controle biológico contendo *B. bassiana* como ingrediente ativo e, portanto, está se consolidando rapidamente como agente de biocontrole (Zhang *et al.*, 2020; Sala *et al.*, 2021).

A capacidade dos fungos entomopatogênicos de regulação das populações de insetos-praga, principalmente devido à frequência de epizootias naturais, permite que sejam empregados no controle biológico clássico, conservativo ou aumentativo. Quando comparado a outros inimigos naturais de insetos, os fungos apresentam a vantagem de sobreviver como esporos em condições ambientais desfavoráveis, apresentando um modo de crescimento dimórfico, onde conídios em repouso, quando encontram condições favoráveis, podem germinar para formar conídios germinativos

e infectar novos hospedeiros, sendo dispersado horizontalmente pelo próprio inseto, vento ou chuva, provando ser fundamentais nas estratégias de MIP por causarem epizootias frequentes de forma dependente da densidade (Shapiro-Ilan *et al.*, 2017; Mascarin e Jaronski, 2016).

Ao contrário de outros agentes de controle microbianos, como vírus, protozoários e bactérias que requerem rotas específicas de infecção (ingestão), os fungos entomopatogênicos infectam artrópodes pela penetração direta na cutícula ou por ingestão, podendo causar a morte em diferentes estágios de desenvolvimento dos insetos dos mais diversos hábitos de vida (Swathy *et al.*, 2024).

A fase parasitária do fungo inicia, normalmente, com a fixação do esporo na cutícula do inseto, sendo que essa ação envolve interações eletrostáticas hidrofóbicas. Em seguida, vem o processo de penetração, que ocorre em áreas mais finas e menos esclerotizadas da cutícula, como articulações, entre segmentos ou peças bucais do hospedeiro, com auxílio de forças mecânicas e enzimas que degradam a cutícula, como quitinases, lipases e proteases. Nessa fase formam-se estruturas de infecção específicas produzidas pelas hifas, chamadas de apressórios, responsáveis pela fixação dos esporos em germinação à superfície, com formação de tubos germinativos que precisam vencer as reações da defesa imunológica do hospedeiro. A germinação depende de vários fatores ligados ao estado fisiológico do hospedeiro, como idade, estado nutricional e diversos outros fatores físicos e químicos, incluindo intensidade da luz ultravioleta, temperatura e umidade (Huarte-Bonnet *et al.*, 2018).

Após vencer a imunidade do hospedeiro, o fungo produz corpos hifais, blastósporos, que são células semelhantes a leveduras, e que são distribuídos passivamente na hemolinfa, permitindo que o fungo invada outros tecidos do hospedeiro, esgotando os nutrientes da hemolinfa e do corpo gorduroso causando a morte do inseto. O fungo então inicia o crescimento saprofítico, emergindo do cadáver, produzindo conídios aéreos na superfície que esporulam em condições ambientais específicas, especialmente de umidade, sendo então disseminados pelo vento e respingos de chuva (Proietti *et al.*, 2023).

A infecção por *B. bassiana* também pode resultar em efeitos subletais com redução da alimentação do inseto, da fecundidade e da sobrevivência das gerações subsequentes (Wang *et al.*, 2018).

Entretanto, os fungos apresentam algumas desvantagens, como maior tempo para ocasionar a morte dos insetos em comparação aos inseticidas químicos, em virtude de o processo de infecção requerer uma quantidade significativa de inóculo, mesmo com estirpes mais virulentas, podendo demorar 2 a 5 dias até que o hospedeiro seja destruído. Este atraso pode permitir que os insetos causem danos às culturas, às vezes significativos, mesmo após a infecção. Outra desvantagem é a suscetibilidade das infecções fúngicas às condições de estresses abióticos, como altos níveis de radiação ultravioleta, baixa umidade relativa e temperaturas desfavoráveis, que são responsáveis pelo seu desempenho variável em campo (Zaman *et al.*, 2020; Parsi *et al.*, 2023).

2.6. *Beauveria bassiana* como fungo endofítico

Uma das formas de proteger o fungo entomopatogênico do estresse abiótico, que tanto limita sua eficácia e reduz sua viabilidade em campo, é a utilização da abordagem endofítica, onde o fungo pode viver de forma assintomática no interior das plantas durante todo ou parte de seu ciclo (Jaber e Ownley, 2018). Essa capacidade de colonizar plantas agregou múltiplas funções ao fungo que, além da capacidade já tradicionalmente conhecida de controle de praga por meio de pulverizações inundativas, atrai cada vez mais atenção na inserção como nova abordagem em Manejo Integrado de Pragas (Parveen e Rashtrapal, 2024).

A descoberta levou a muitos estudos para demonstrar a relação simbiótica entre fungos e plantas e os seus efeitos negativos sobre os insetos herbívoros (Dara, 2019; Barra-Bucarei *et al.*, 2020; Mantzoukas e Eliopoulos, 2020). O termo “endofítico” foi primeiro mencionado pelo cientista alemão Heinrich Anton de Barry em 1884 e é usado para definir os microorganismos que se estabelecem no interior do tecido vegetal, por algum período de sua vida, sem causar sintomas e problemas às plantas (Quesada Moraga, 2020).

As evidências dessa associação parecem indicar um estilo de vida complexo dos fungos entomopatogênicos, onde vivendo em ambiente de solo, podem utilizar as

plantas como endofíticos facultativos, empregando o mesmo mecanismo para penetrar e se estabelecer no interior da planta e proporcionar benefícios à planta hospedeira, ativando sistema de defesa que expressa seu impacto positivo sobre a planta hospedeira, fazendo com que ela resista à influência de estresse biótico na redução de heboria de insetos-praga, podendo ainda proporcionar habilidades para mitigar fatores de estresses abióticos, incluindo seca, salinidade, metais pesados e outros compostos tóxicos introduzidos no meio ambiente (Wagner e Lewis, 2000; Landa *et al.*, 2013; Akram *et al.*, 2023; Ghorai, 2023).

Outras evidências importantes na associação entre fungos entomopatogênicos e plantas são decorrentes do efeito direto em insetos com desenvolvimento endofítico, cujo controle é dificultado, como o resultado encontrado por Akello (2008) com aplicação de *B. bassiana* em solo que propiciou colonização endofítica de mudas de banana, reduzindo os danos e controlando o estágio larval da broca-do-rizoma da bananeira, *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) (Coleoptera: Curculionidae), situação que permaneceu por mais de dois meses.

Outro benefício da associação do fungo com a planta é a capacidade de transferência de nitrogênio derivado de insetos para a planta (Behie e Bidochka, 2014; Behie *et al.*, 2015). Essa transferência de nutrientes pode estar relacionada à promoção do crescimento nas plantas colonizadas, como estudos realizados por Jaber e Enkerli (2017) avaliando o estado nutricional de plantas colonizadas por fungo entomopatogênico.

A associação simbiótica promovida pela colonização por fungos entomopatogênicos, em especial *B. bassiana*, pode ainda ter um efeito indireto sobre o inseto, ou seja, uma faceta crucial ligada à ecologia química que pode ativar defesas da planta com produção de metabólitos secundários afetando a interação herbívoro-planta (Ríos-Moreno *et al.*, 2016). Essa ação ocorre por meio de enzimas biológicas conhecidas como “biocatalisadores”, as quais podem desencadear reações bioquímicas específicas ativando as defesas da planta hospedeira, protegendo-a do ataque de insetos através da produção de metabólitos ativos ou pela indução de resistência (Gange *et al.*, 2007; Mckinnon *et al.*, 2018).

Por conta disso, os endófitos têm sido chamados de “sintetizadores químicos” dentro das plantas, promovendo resistência sistêmica induzida por ativarem várias

classes químicas de metabólitos secundários, regulada por etileno ou ácido jasmônico, que podem atuar no mecanismo de ação envolvendo antibiose ou repelência alimentar induzida pelas toxinas que estes organismos produzem nas plantas. Essas ocorrências interferem no comportamento do inseto na busca pela planta/alimento e quando ingerem essas plantas colonizadas podem ter prejuízos no processo de oviposição, por exemplo (Alkhoury, 2021).

Alguns autores explicam, usando isótopo radiotivo de microcosmo, mostraram que a associação do fungo, planta e inseto pode formar uma interação tripartite permitindo a transferência de nutrientes entre o fungo, a planta e o inseto, em que o fungo coloniza, tanto as células das raízes das plantas quanto as larvas do solo que se alimentam do tecido radicular, havendo a transferência de nitrogênio dos insetos para as raízes das plantas (Behie *et al.*, 2017).

Os fungos podem colonizar diferentes plantas por meio de vários métodos de inoculação artificial, incluindo tratamento de sementes, irrigação de raízes, injeção de caule e pulverização foliar (Vega, 2008). Jaber e Enkerli (2016) demonstraram que *B. bassiana* pode colonizar sistemicamente diferentes partes de plantas de *Vici faba* (Fabales: Fabaceae) e melhorar o crescimento quando aplicado como agente de tratamento de sementes. Pode ser transmitida verticalmente, de uma geração para outra, ou horizontalmente, de um tecido vegetal para outro. Outro resultado semelhante foi obtido com sementes de trigo tratadas com *B. bassiana* e inoculadas em solo, onde os esporos foram capazes de deslocar dos locais de inoculação para partes superiores da planta e sobreviver nos tecidos (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018).

Beauveria bassiana foi isolada de várias espécies de plantas naturalmente ou artificialmente inoculadas, usando diferentes métodos de inoculação, incluindo: algodão, *Gossypium hirsutum* (Malvales: Malvaceae); banana, *Musa* spp. (Zingiberales: Musaceae); milho, *Zea mays* (Poales: Poaceae); sorgo, *Sorghum bicolor* (Poales: Poaceae); café, *Coffea arabica* (Gentianales: Rubiaceae); soja, *Glycine max* (Fabales: Fabaceae); tabaco, *Nicotiana tabacum* (Solanales: Solanaceae); tomate, *Solanum lycopersicum* (Solanales: solanaceae), feijão, *V. faba* e trigo (*Triticum aestivum*) (Poales: Poaceae) (Vega, 2018); e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (Poales: Poaceae) (Donga *et al.*, 2018; Kasambala Donga *et al.*, 2021).

Os métodos utilizados para inoculação artificial de *B. bassiana* endofítica em plantas compreendem imersão de raízes, encharcamento do solo, pulverização de folhagens e tratamentos de sementes (Canassa *et al.*, 2019; Kasambala Donga *et al.*, 2021). Alguns estudos revelaram que o tratamento de sementes por *B. bassiana* resulta em colonização endofítica de partes da plantas acima do solo de forma eficaz (Jaber e Ownley, 2018; Canassa *et al.*, 2019), sendo transmitida verticalmente como endófito através de sementes infectadas produzidas das plantas hospedeiras, incluindo pinheiro, *Pinus radiata* (Pinales: Pinaceae), e trigo (*T. aestivum*) (Sánchez Rodríguez *et al.*, 2018).

A detecção de endófitos é tipicamente alcançada por meio de várias técnicas, incluindo o isolamento direto de material fúngico do tecido vegetal para o meio de crescimento (dependente da cultura), detecção molecular de DNA endofítico do material vegetal por PCR, necessitando de rigorosos protocolos para esterilização de superfícies, incluindo controles experimentais completos, como protocolos de detecção molecular por PCR DNA residual de inóculos de superfície (Vidal e Jaber, 2015).

As técnicas para detecção de endófitos são importantes para validar o processo de colonização e auxiliar na compreensão dos processos biológicos envolvidos, além do estabelecimento e persistência do estágio endofítico. Porém, essa detecção é reconhecida como problemática e dependente do método de recuperação (Wagner e Lewis, 2000; Landa *et al.*, 2013; Quesada Moraga *et al.*, 2014).

Os processos de detecção do fungo em plantas podem ser relativamente simples, baseados em metodologias que dependem da cultura (Tan *et al.*, 2019). Contudo envolvem complexas etapas que devem ser criteriosamente seguidas para evitar erros de interpretação, como a coleta do material vegetal e os passos para desinfecção superficial do tecido amostrado (Mckinnon *et al.*, 2018).

Após a coleta do material vegetal, as amostras devem ser colocadas em recipientes estéreis e processadas em até 24 horas, sob condições assépticas e esterilização de superfície da amostra utilizando o método que deve seguir um protocolo de desinfecção capaz de remover completamente a microbiota epifita sem interferir na microbiota endofítica. Esse protocolo geralmente é feito em três etapas básicas que compõem desinfestação química, onde as amostras devem ser imersas

por cinco segundos em etanol 95%, depois por dois minutos em hipoclorito de sódio 0,5% e por fim por dois minutos em etanol 70%, seguido de lavagens sucessivas com água destilada estéril (Shadmani *et al.*, 2021).

As amostras vegetais devidamente esterilizadas são distribuídas em meio de cultura enriquecido com determinado substrato para evitar crescimento de outros microorganismos específicos, incubadas em condições controladas e, após o crescimento do fungo, as colônias são purificadas e o isolado identificado por meio de características morfológicas ou análises moleculares. Apesar dos avanços nas metodologias para estudar fungos endofíticos, diversas barreiras surgem em todas as etapas dos protocolos comumente utilizados, exigindo estratégias bem estabelecidas para evitar interpretações errôneas (Reis *et al.*, 2022).

A utilização de microscopia óptica, eletrônica de varredura e técnicas moleculares forneceram métodos para confirmação da colonização de *B. bassiana* em plantas detectando a atividade endógena do fungo e permitindo a observação da penetração do micélio (Landa *et al.*, 2013; Behie *et al.*, 2015). No caso do milho, sua distribuição nos tecidos vegetais foi esclarecida mediante uso de cepas marcadas com proteína verde fluorescente (GFP), o que fornece suporte técnico para uma maior exploração da colonização endofítica em tecidos vegetais (Sui *et al.*, 2022).

A avaliação da colonização endofítica por *B. bassiana* foi verificada por Quesada-Moraga (2020), combinando métodos microbiológicos, moleculares e microscópicos para reisolar e detectar o fungo, utilizando papoula do ópio, *Papaver somniferum* (Ranunculales: Papaveraceae) inoculada por pulverização foliar, onde as hifas foram detectadas em espaços intercelulares do xilema por qPCR e microscopia de varredura a laser (Landa *et al.*, 2013).

A combinação de múltiplas técnicas de detecção endofítica deve ser usada, onde os métodos dependentes de cultura são os mais diretos informando sobre fungos viáveis endófitos, enquanto as técnicas de PCR e qPCR são muitas vezes mais sensíveis, embora não indiquem se o material fúngico na planta é constituído de células vivas. As técnicas microscópicas são úteis para a detecção visual de partes específicas da planta colonizada e localização de estruturas fúngicas (Matušinsky *et al.*, 2024).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estabelecimento da criação de *Sphenophorus levis*

Criações de insetos têm a finalidade de prover indivíduos, em quantidade e qualidade, que serão utilizados em pesquisa básica ligada à biologia, ecologia e genética, contribuindo ainda para estudos ligados a técnicas de controle (De Bortoli *et al.*, 2018). Para estabelecer a criação de *S. levis* foi necessário realizar coletas semanais de adultos em áreas com histórico de infestação, localizadas no município de Jaboticabal, São Paulo.

As coletas foram realizadas por meio de iscas confeccionadas com toletes de cana-de-açúcar com aproximadamente 30,0 cm de comprimento, cortadas longitudinalmente, e instaladas com a face interior do colmo voltada para o solo, próximos às touceiras das plantas para atração dos insetos (Figura 1).



Figura 1 - Instalação das Iscas confeccionadas com toletes na base de touceira de cana para a captura de adultos de *Sphenophorus levis*.

Após três dias da instalação das iscas no campo, os insetos eram coletados e transportados para laboratório, onde eram higienizados e acondicionados em potes plásticos (28,0 cm de comprimento x 21,4 cm largura x 10,4 cm de altura) contendo colmos de cana de 15,0 cm de comprimento, cortados longitudinalmente, com a parte cortada voltada para baixo (Figura 2 B), os quais serviam como substratos alimentar e após a cópula (Figura 2 A) as fêmeas utilizam para oviposição.

Os colmos eram substituídos a cada três dias, retirados e cuidadosamente descascados com auxílio de um canivete para a coleta dos ovos (Figura 2 C e D), que

eram lavados com uma solução de sulfato de cobre (1,0%) e posteriormente acondicionados em placas de acrílico (6,0 cm de diâmetro), contendo papel filtro e 10 mL de ágar para manutenção da umidade (Figura 3 A), sendo mantidos em temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12:12 h até a eclosão das larvas.

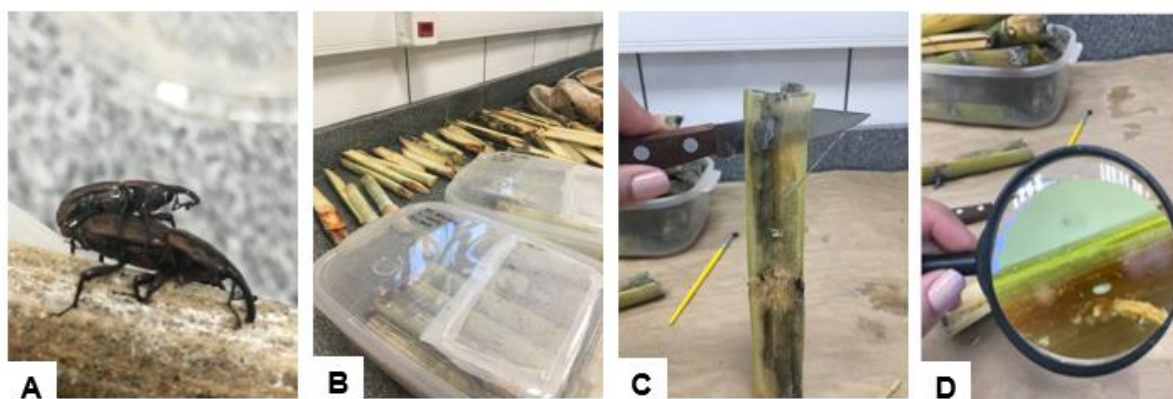


Figura 2 - Criação *Sphenophorus levis* para obtenção de ovos e larvas. A - Cópula dos *S. levis* nas caixas; B - Troca dos colmos de cana-de-açúcar para alimentação dos insetos; C – Descasque da cana para retirada dos ovos, D - Postura endofítica dos ovos.

As larvas recém-eclodidas (Figura 3 B) eram retiradas da placa de Petri com o auxílio de um pincel nº 000 (Figura 3 C) e transferidas para tubos de ensaio de ensaio (9,0 mm de diâmetro), autoclavado, contendo dieta artificial (Figura 3 D).

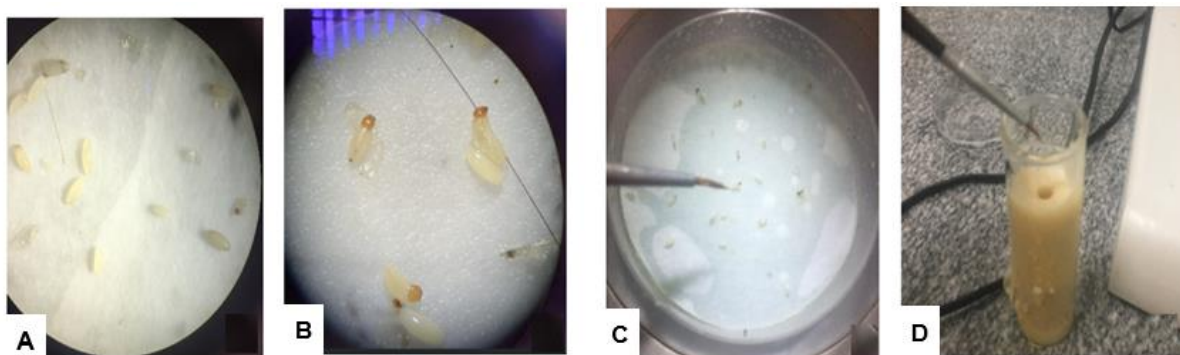


Figura 3 - Manutenção das larvas de *Sphenophorus levis* em dieta artificial. A - Ovos *S. levis*; B - Larvas recém eclodidas; C - Coleta das larvas com auxílio de pincel; D - inserção da larva na dieta artificial.

A dieta utilizada na criação foi preparada seguindo proposta de Degaspari et al. (1987) (Tabela 1), onde os ingredientes eram pesados e misturados com auxílio de um liquidificador industrial de 10,0 litros e depois cuidadosamente vertidos em tudos de ensaio de fundo chato (9,0 mm de diâmetro) previamente autoclavados.

Tabela 1 - Dieta artificial para criação de *Sphenophorus levis* descrita por Degaspari (1987).

Ingredientes	Quantidade	Função
Água destilada	1,6 L	Solvente
Açúcar cristal	95,0 g	Carboidrato
Cana-de-açúcar moída	25,0 g	Fibra
Germe de trigo	95,0 g	Proteína
Ácido ascórbico	18,0 g	Vitamina C
Sais de Wesson	45,0 g	Sais minerais
Solução vitamínica	45,0 ML	Vitaminas
Caragenato	113,0 g	Gelificante
Nipagin	7,0 g	Anticontaminante
Ácido sórbico	7,0 g	Anticontaminante

Os tubos de vidro contendo as larvas de *S. levis* eram vistoriados diariamente e trocados a cada cinco dias, conforme as larvas se desenvolviam, para evitar contaminação (Figuras 4 A e B). Após a formação da câmara pupal (Figura 4 C), as trocas de tubos não eram mais realizadas. Após a emergência dos adultos (Figura 4 D) eles eram transferidos para os potes de criação, retomando o ciclo de desenvolvimento.

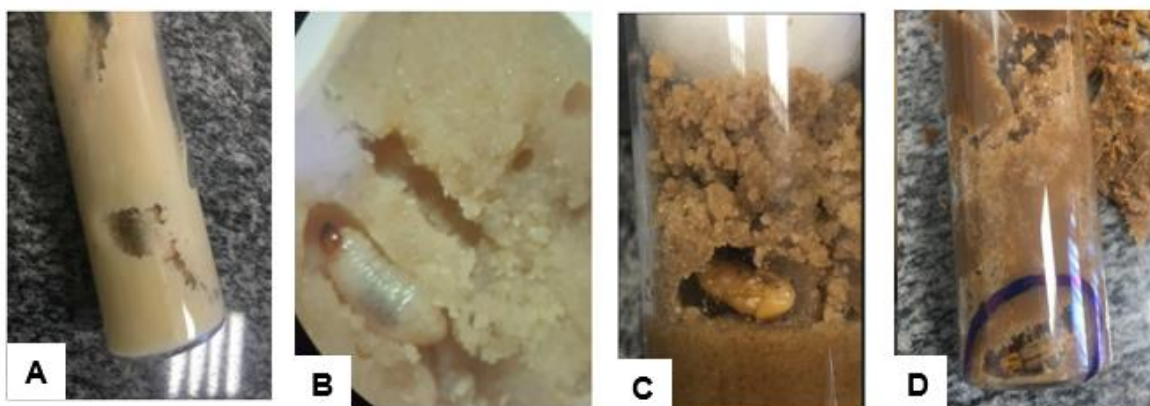


Figura 4 - Desenvolvimento do *Sphenophorus levis* em dieta artificial. A e B - Larva de duas semanas; C - Pupa; e D - Adulto.

3.2. Estimativa da concentração letal média (CL₅₀) de *Beauveria bassiana* para larva de *Sphenophorus levis*

3.2.1. Preparo dos isolado fúngicos para realização dos bioensaios

Para preparação das doses testadas nas larvas de *S. levis* foi utilizado o isolado IBCB 66 de *B. bassiana* obtido do Instituto Biológico de São Paulo, pesando-se 0,10 g de esporos puros e diluindo-os em 200,0 ML de água esterilizada, misturando-se em agitador magnético por 15 minutos. Em seguida realizou a diluição seriada para quantificação dos conídios utilizando-se o método de contagem em câmara de Neubauer (Alves *et al.*, 1998). Para a determinação foi colocado 1,0 ML da suspensão original em 9,0 ML de água esterilizada, agitando-se como anteriormente citado. Após a quantificação, a suspensão de esporos de *B. bassiana* foi diluída para formar as doses das concentrações a serem testadas nas larvas.

Para estimar a concentração letal (CL₅₀) foram utilizadas onze concentrações de conídios e uma testemunha. A seleção das concentrações passou por um pré-

seleção para determinar aquelas que matavam cerca de 10,0% e 90,0% da população-teste, selecionando as concentrações entre esses extremos. As suspensões selecionadas foram: $0,35 \times 10^5$; $0,75 \times 10^5$; $0,50 \times 10^6$; $0,70 \times 10^6$; $0,90 \times 10^6$; $1,00 \times 10^7$; $0,50 \times 10^7$; $0,25 \times 10^7$; $0,75 \times 10^7$; $1,00 \times 10^8$ e $0,25 \times 10^8$ conídios ML^{-1} (Tabela 2).

Tabela 2 - Doses de *Beauveria bassiana* utilizadas para a avaliação da toxicidade para larvas de *Sphenophorus levis*.

Tratamentos	Conídios
1 – Testemunha	--
2 – Dose 1	$0,35 \times 10^5$ conídios ML^{-1}
3 – Dose 2	$0,75 \times 10^5$ conídios ML^{-1}
4 – Dose 3	$0,50 \times 10^6$ conídios ML^{-1}
5 – Dose 4	$0,70 \times 10^6$ conídios ML^{-1}
6 – Dose 5	$0,90 \times 10^6$ conídios ML^{-1}
7 – Dose 6	$1,00 \times 10^7$ conídios ML^{-1}
8 – Dose 7	$0,50 \times 10^7$ conídios ML^{-1}
9 – Dose 8	$0,25 \times 10^7$ conídios ML^{-1}
10 – Dose 9	$0,75 \times 10^7$ conídios ML^{-1}
11 – Dose 10	$1,00 \times 10^8$ conídios ML^{-1}
12 – Dose 11	$0,25 \times 10^8$ conídios ML^{-1}

Para cada concentração testada foram utilizadas dez larvas, repetindo três vezes. Os resultados das mortalidades foram analisados utilizando o software R (R Development Core Team, 2008), onde os dados foram transformados em porcentagem e o número de esporos transformados em $\log x$ para gerar um gráfico “mortalidade vs $\log x$ ” usando GraphPadPrism 5. A precisão do ajuste dos dados ao sigmoide com o modelo da curva avaliado com base no valor R^2 .

3.2.2. Bioensaio de mortalidade

Para o ensaio de mortalidade preparou-se a dieta (Tabela 1) para a alimentação das larvas tratadas com as diferentes doses de *B. bassiana* que necessitam de substrato para sobreviver. A dieta preparada seguindo a receita descrita por Degaspari (1987) (Tabela 1), vertida em tubos de ensaio de fundo chato (9,0 mm de diâmetro) previamente autoclavado, sendo que após sua solidificação e resfriamento

foi cuidadosamente removida dos tubos e cortada em porções cilíndricas de aproximadamente 5,0 cm de espessura (Figura 5 A). Os pedaços receberam um furo central confeccionado com um pequeno bastão cilíndrico de madeira, previamente esterilizado, para acomodar as larvas tratadas com as concentrações do inóculo do fungo e, posteriormente acondicionados em potes de polietileno (1,8 cm x 3,0 mm) com tampa (Figura 5 C).

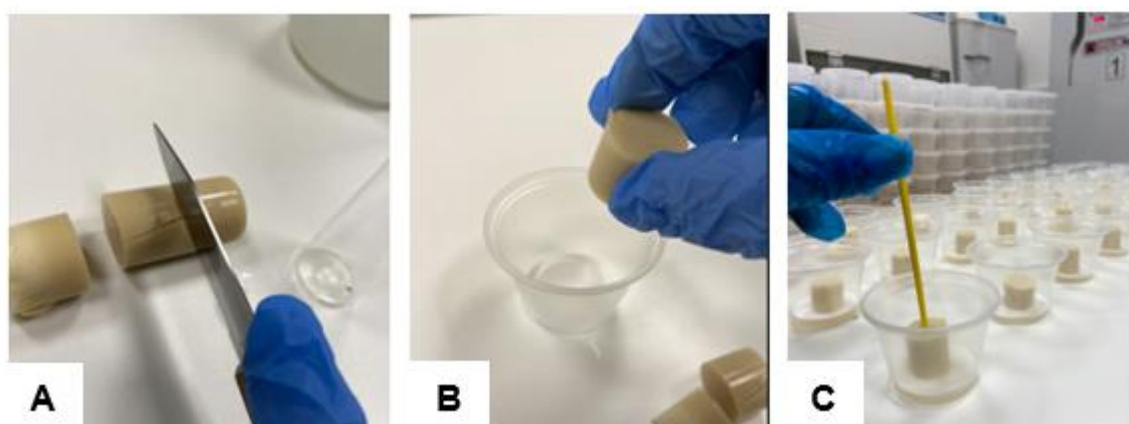


Figura 5 – Preparação do teste de mortalidade para larvas de *Sphenophorus levis*. A - Corte da dieta; B - Peça acomodado no pote plástico; e C - Furo central para receber a larva tratada.

Com o auxílio de uma pipeta, 1000,0 μ L da suspensão de cada concentração foram aplicados sobre 10 larvas (com dez dias de vida). Em seguida, as larvas tratadas foram cuidadosamente inseridas, individualmente, no furo feito no pedaço da dieta e mantida em potes plásticos com tampa em ambiente ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas) (Figura 6). Para a testemunha, realizou-se o mesmo procedimento

substituindo-se a suspensão fúngica por água destilada. Foram utilizadas dez larvas para cada dose testada, repetindo três vezes.

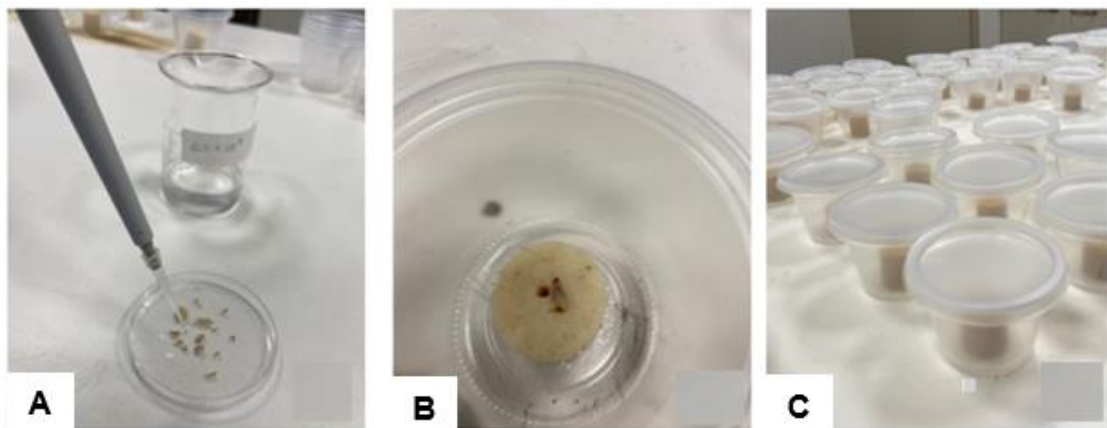


Figura 6 - Tratamento das larvas com inóculo. A - Aplicação da dose nas dez larvas; B - Larva tratada com fungo inserida na dieta artificial; C - Manutenção em ambiente escuro com temperatura e umidade controladas.

A mortalidade das larvas submetidas aos tratamentos foi avaliada após 10 dias do início do bioensaio, registrando-se os números de larvas mortas e vivas, considerando-se mortas aquelas que não apresentaram nenhum movimento ao serem tocadas por um pincel de cerdas macias, sendo confirmado em câmara úmida ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas) que a morte foi provocada pelo fungo, constatando-se a produção de conídios sobre o corpo do inseto de todos os indivíduos tratados (Figura 7).

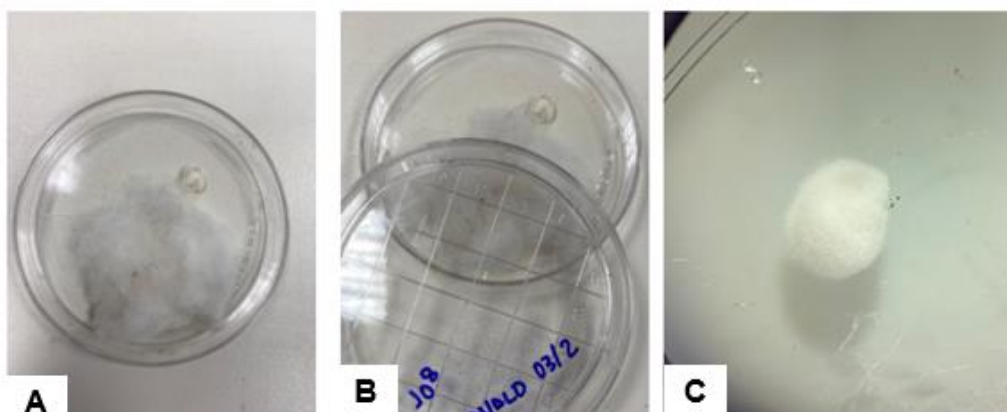


Figura 7 - Confirmação da mortalidade da larva por *Beauveria bassiana* utilizando câmara úmida.

3.3. Bioensaios com *Beauveria bassiana* endofítica na alteração do comportamento de *Sphenophorus levis* na busca pela planta e redução do dano larval em cana-de-açúcar

Os experimentos foram conduzidos em condições de casa de vegetação e no laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga- LCMAP, Departamento de Ciências da Produção Agrícola, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brasil, sendo realizado em duas etapas, (1) com avaliação do fungo *B. bassiana* em colonização endofítica em plantas de cana-de-açúcar sobre a preferência do adulto *S. levis* e (2) o efeito da interação simbiótica fungo-planta-inseto na redução do dano e controle larval *S. levis*.

3.3.1. Preparo do inóculo

Para condução dos dois experimentos, foi necessário o preparo do inóculo para tratamento das plantas experimentadas. Determinou-se a densidade de conídios utilizando o método da contagem de conídios com auxílio de câmara de Neubauer, ajustado para $1,6 \times 10^6$ conídios/ML. Para isso, uma alíquota da solução original foi retirada para verificar a viabilidade dos conídios, 150,0 μ L da solução fúngica foram inoculados em placas de Petri tipo Rodac[®] (Replicate Organism Detection and Counting, 60,0 x 10,0 mm) contendo 5,0 ML de meio de cultura B.D.A com antibiótico

Pentabiótico (5,0 mg/L) e 10,0 µL/L do fungicida Dodine[®] e incubadas em B.O.D. (25± 2°C e 65± 10% UR e 14 horas de fotofase) por 24h. A análise de viabilidade foi realizada por contagem direta em microscópio de contraste de fase (Carl Zeiss- Axio Lab A1) em aumento de 400 x, totalizando 200 conídios por placa. Os conídios foram removidos em condições estéreis mediante raspagem da superfície das placas e coletados em uma peneira (abertura de 150,0 µm), onde foram suspensos em 200,0 ml de Tween[®] 80 a 0,01% em um frasco de 500,0 mL.

3.3.2. Tratamento das plantas

Para a etapa (1), de verificação do efeito da colonização endofítica do fungo nas plantas sobre o comportamento do inseto na seleção das plantas hospedeiras, foram utilizadas sessenta mudas-pré-brotadas de cana-de-açúcar de uma semana, variedade CTC 4, plantadas em vasos de 1,0 L preenchidos com 600,0 g de solo, sem adubação, autoclavado e irrigado diariamente. O tratamento consistiu em trinta plantas inoculadas com 30,0 ml da suspensão de *B. bassiana* contendo $1,6 \times 10^6$ conídios/ML⁻¹, aplicados ao solo de cada vaso, próximo às raízes, com auxílio de uma seringa, distribuídos de forma homogênea (Figura 8) e o controle, consistiu de trinta plantas inoculadas com 30,0 ml de água autoclavada com Tween[®] 80 a 0,01%. O experimento foi replicado duas vezes e inteiramente casualizado.

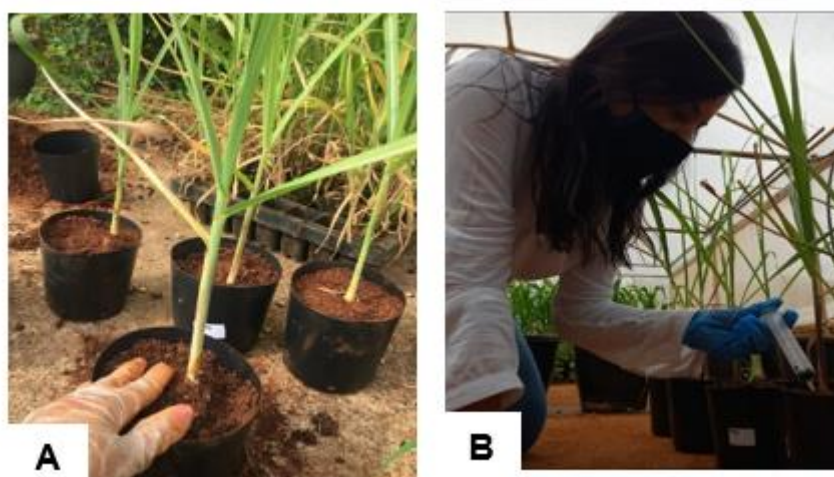


Figura 8 - A - Preparo das mudas pré-brotadas (MPB) CTC 4 ; B - Inoculação com o fungo *Beauveria bassiana* na concentração de $1,6 \times 10^6$ conídios ML⁻¹.

3.3.3. Confirmação da colonização endofítica

Antes de proceder com os bioensaios de avaliação de preferência dos insetos, foi realizada a confirmação da colonização endofítica de *B. bassiana* nas plantas. Após 15 dias de inoculação do fungo *B. bassiana* IBCB 66 na concentração de $1,6 \times 10^6$ conídios ML^{-1} , dez plantas foram selecionadas e mais dez da testemunha para coleta de folha, colmo e raiz que passaram por um rigoroso protocolo de esterilização da superfície seguindo o procedimento descrito por Rondot e Reineke (2018), onde cada amostra foi imersa em água destilada duas vezes, sendo depois imersas, consecutivamente por cinco segundos em etanol 95,0 %, por dois minutos em hipoclorito de sódio 0,5 % e por fim por dois minutos em etanol 70,0 % e lavagens sucessivas com água destilada estéril.

Em seguida, as amostras foram colocadas em meio seletivo para *B. bassiana*, descrito por Meyling e Eilenberg (2006) contendo $0,60 \text{ g L}^{-1}$ de estreptomicina (Sigma-Aldrich), $0,10$ de tetraciclina g L^{-1} (SigmaSyllit, Aldrich), $0,05 \text{ g L}^{-1}$ do fungicida Dodine® e $0,05 \text{ g L}^{-1}$ de cicloheximida (Sigma-Aldrich), e incubadas em B.O.D. ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $65 \pm 10\%$ UR e 14 horas de fotofase) por 7 dias. Passado o período de incubação, as placas foram examinadas visualmente quanto ao crescimento micelial do fungo. Com base em características de identificação para *B. bassiana* descritas por Humber (1997), foi possível confirmar a presença endofítica do fungo, que se desenvolveu a partir dos tecidos internos vegetais (Figura 13).

3.3.4. Efeito da colonização endofítica por *Beauveria bassiana* sobre a atratividade de cana-de-açúcar a adultos de *Sphenophorus levis*

3.3.4.1. Bioensaios de atração com olfatômetro

Para avaliação da resposta comportamental de adultos *S. levis* aos estímulos olfativos emitidos pelas plantas, foram utilizadas mesmas plantas tratadas com fungo do descrita no item 3.3.2 e plantas controle sem fungo apenas com água. Foram utilizadas 210 fêmeas acasaladas de *S. levis*, sexadas de acordo com as características taxonômicas da espécie (Vaurie, 1978) e mantidas em um recipiente escuro, privados de alimentos por 24 horas.

Os bioensaios foram realizados sob condições de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa ($65 \pm 10\%$ UR) e fonte de luz natural das 14:00 às 18:00 horas. As

respostas comportamentais foram avaliadas num olfatômetro “Y”, constituído de um tubo central (15,0 cm de comprimento e 3,0 cm de diâmetro) cujas extremidades foram acopladas rolhas de vidro para conexão em mangueiras de silicone (1,0 cm de diâmetro). Cada braço lateral do olfatômetro foi conectado a uma cuba de vidro (40,0 cm altura e 20,0 cm de diâmetro), onde foram dispostos a planta tratada com o fungo e a outra cuba a planta controle. O fluxo de ar filtrado e umidificado dentro do sistema estabelecido em $0,20 \text{ L min}^{-1}$ foi obtido por meio de bomba a vácuo e regulado por um fluxômetro dispostos nas extremidades da entrada de ar para cada tubo lateral do olfatômetro. Ensaios preliminares foram realizados para determinar o tempo médio necessário para escolha dos adultos, sendo padronizado em 5 minutos.

Uma fêmea foi introduzida, individualmente, no braço central do olfatômetro e observada até que ultrapassasse a linha de escolha marcada em cada braço, distante 7,0 cm do centro do equipamento. Somente o inseto que fizesse a escolha dentro do intervalo de tempo era considerado responsivo. Após cada indivíduo utilizado a posição do olfatômetro era invertido em 180° . Para cada 10 insetos utilizados no bioensaio as plantas eram substituídas e todos os componentes do olfatômetro eram lavados com detergente neutro. Empregou-se o Delineamento Inteiramente Casualizado, sendo utilizado 60 insetos para as plantas inoculadas com o fungo e 60 insetos para o controle, replicados cinco vezes.

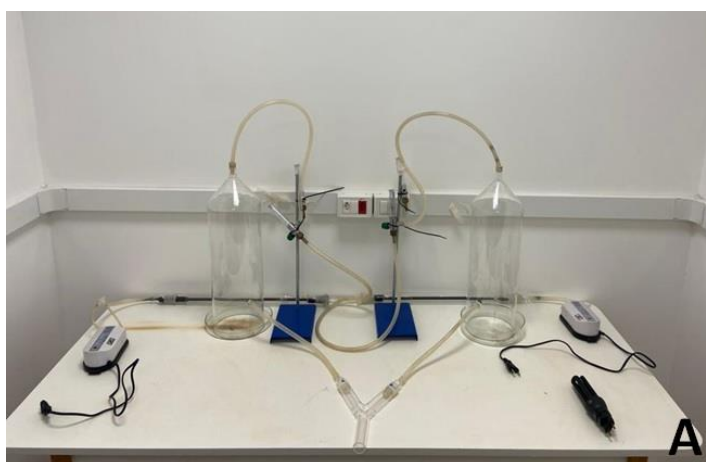


Figura 9 - Configuração do olfatômetro.

3.3.5. Efeito da colonização endofítica por *Beauveria bassiana* sobre os danos larvais de *Sphenophorus levis* em cana-de-açúcar

3.3.5.1. Obtenção das plantas

Para o experimento (2) , onde avaliou-se o efeito da colonização endofítica nos danos causados pela larva de *S. levis*, foram utilizadas 210 mudas-pré-brotadas de cana-de-açúcar da mesma variedade do experimento anterior, plantadas em vasos de polietileno de 3,0 L contendo 2,6 kg de solo e areia , que foram autoclavados, adubados com 0,45 g de sulfato de amônio e 0,25 g de cloreto de potássio diluído em 50 ML de água, sendo as mudas irrigadas diariamente e mantidas em casa de vegetação até a planta atingir um diâmetro médio de colmo de 2,0 cm (aproximadamente três meses).

Após as plantas atingirem os requisitos mínimos estabelecidos, elas foram inoculadas com a mesma concentração de $1,6 \times 10^6$ conídios/ML⁻¹ de *B. bassiana* da mesma forma descrito no item 3.3.2, o mesmo procedimento foi aplicado ao controle substituindo a solução contendo o fungo por água autoclavada com 0,01% (Tween® 80). Em seguida, os vasos foram cobertos com uma manta térmica de jardim para evitar contaminação cruzada por partículas de solo durante a irrigação.

As plantas permaneceram em casa de vegetação e foram irrigadas diariamente por aspersão. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado utilizando um total de 210 plantas, sendo 35 plantas para tratamento e 35 plantas para controle, repetindo 5 vezes.

3.3.5.2. Infestação artificial com ovo e larva de *Sphenophorus levis*

Após 15 dias de inoculação do fungo nas plantas procedeu-se o processo de infestação artificial, seguindo o modelo de Schneider et al. (2017). Para introdução de uma larva e um ovo, dois orifícios foram abertos nas plantas com profundidade de aproximadamente 2 mm realizada com auxílio de uma furadeira manual (WAP a bateria 740 RPM) acoplada com uma broca de 3,0 mm (Figura 10). Os orifícios foram feitos de forma paralela, um acima do outro, próximo ao colo da planta, rente à superfície do solo (Figura 10 B). Em seguida, com auxílio de um pincel de cerdas finas (esterilizado), uma larva com dez dias de idade e um ovo de dez dias de incubação de *S. levis* foram cuidadosamente retirados da dieta artificial e substrato de postura, respectivamente, e

introduzidos em cada um dos orifícios. Os orifícios foram vedados com pequenos chumaços de algodão embebidos em parafina e cobertos com uma fita plástica flexível para impedir a entrada de possíveis insetos ou fungos oportunistas, assim como a saída das larvas. A ordem de infestação artificial das larvas e ovos foi realizada primeiramente nas plantas do controle e depois nas inoculadas com o fungo.

O experimento foi inteiramente casualizado, sendo utilizadas 30 plantas para o tratamento com fungo e 30 plantas controle, com três repetições.

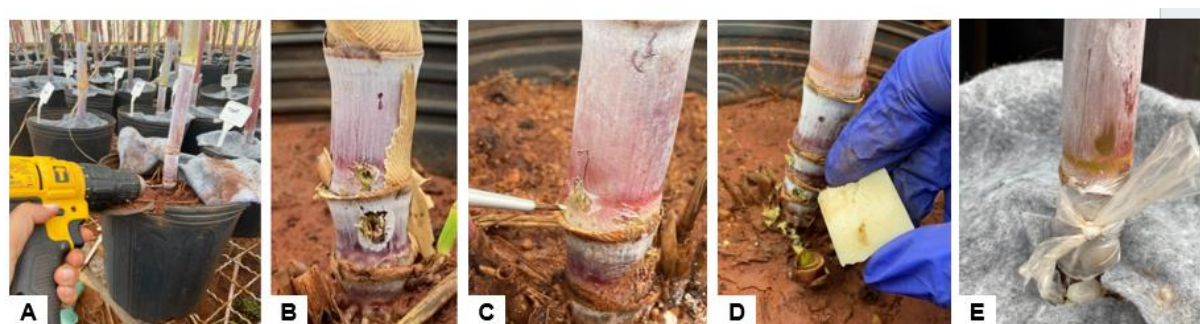


Figura 10 - Infestação artificial. A – Perfuração com auxílio de uma furadeira elétrica; B – Disposição dos furos; C - Introdução do ovo; D - Introdução da larva retirada direto da dieta; E- Vedação com algodão parafina e fita plástica.

3.3.5.3. Avaliação dos danos

Passados 30 dias da infestação artificial, as plantas foram retiradas dos vasos e o solo removido com água corrente. Em seguida, foram realizados cortes transversais para eliminação da parte aérea das plantas, deixando apenas a parte basal do colmo com as raízes. Na sequência, cada planta foi aberta com um corte longitudinal dividindo-se o colmo ao meio, em duas partes iguais, para visualização dos danos internos causados pelas larvas de *S. levis*.

As plantas foram posicionadas, individualmente, em uma cabine fotográfica, com fundo branco, com as dimensões de 20,0 cm x 20,0 cm (Figura 11B) para padronização da distância entre a lente da câmera e o colmo. Uma régua foi posicionada ao lado das plantas para o estabelecimento da escala (Figura 11 C). As imagens foram capturadas por uma câmera digital de celular com 12 megapixel de

resolução, armazenadas para análise para estimar os danos utilizando o programa de imagem *Image J*®.

A estimativa da área danificada pela ação de *S. levis* foi realizada por uma técnica do ajuste limiar de contraste de cores do “software”, que seleciona a área sadia (S) da área danificada (D) (Figura 11 D) e contabiliza as áreas selecionadas e converte os valores de pixels em cm², com base na escala estabelecida. Por fim, os valores convertidos foram aplicados a uma fórmula para obter o dano total $\{AD\% = [D/(D+S)]*100\}$. Importante ressaltar que a porcentagem dano foi estabelecida para a área danificada da seção longitudinal do colmo, com o percentual sendo a média das duas metades seccionadas. Além disso, o corte transversal foi sempre realizado no segundo internódio, pois normalmente as larvas de *S. levis* se desenvolvem na região basal da planta.

Ao final dos registros fotográficos, as larvas e ovos encontrado nos tratamentos foram registrados e transferidos para placas de Petri acrílicas descartáveis (9,0 cm de diâmetro) e mantidas em B.O.D. ($25\pm 2^\circ\text{C}$ e $65\pm 10\%$ UR e 14 horas de fotófase) por 24h para confirmação da mortalidade.



Figura 11 - Avaliação do dano utilizando programa *ImageJ*®. A - Preparo da planta para fotografia; B - Cabine para captura das imagens; C - Imagem do colmo obtida para análise; D - Processamento da imagem.

3.4. Análises estatísticas

Para experimento de estimativa da CL_{50} os dados de mortalidade das foram submetidas a análise de variância analisados utilizando o software R[®] (R Development Core Team, 2008).

Nos experimentos de preferência e avaliação de dano laval de *S. levis* as análises estatísticas e plotagem dos gráficos foram realizadas utilizando o GraphPrism V9.1. Dada a distribuição normal observada após o teste de Kolmogorov-Smirnov ($\alpha = 0,05$), as médias de % de danos e % de preferências foram comparadas pelo teste t ($\alpha = 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Estimativa da Concentração Letal (CL_{50})

A concentração letal CL_{50} foi estimada avaliando-se as onze concentrações de conídios *B. bassiana* IBCB66 e uma testemunha sobre as larvas, onde os dados obtidos da mortalidade das larvas após os tratamentos foram transformados em percentual, enquanto as concentrações dos esporos foram transformadas em logaritmo de x ($\log x$), gerando uma curva de dose resposta (Figura 12). O modelo sigmoidal avaliado apresentou como CL_{50} a concentração de $1,6 \times 10^6$ conídios ML^{-1} . Os resultados confirmam a eficiência da metodologia proposta, podendo ser utilizada em larvas de insetos crípticos para estimar concentração letal.

Analisando a distribuição de mortalidade (Figura 12) das larvas de *S. levis* pelo isolado IBCB66 de *B. bassiana* foi possível verificar a relação do aumento da concentração com a mortalidade das larvas, avaliada 10 dias após a instalação do bioensaio, mediante contagem do número de larvas mortas, isto é, aquelas que não respondiam ao toque com um pincel pequeno de cerdas macias, bem como a confirmação da causa da mortalidade pelo fungo por meio de câmara úmida para extrusão do patógeno (Figura 7).

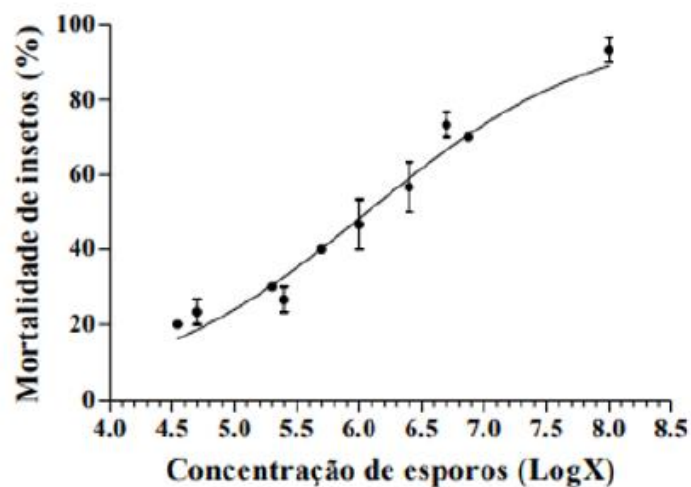


Figura 12 - Curva dose-resposta CL_{50} *Beauveria bassiana* em larva de *Sphenophorus levis* com coeficientes de dados de mortalidade transformados em percentual e a concentração dos esporos em log x.

Os resultados obtidos demonstram a eficácia do método proposto, o qual foi registrado em patente, Processo Número BR 10 2023 019045 6, uma vez que as larvas apresentaram mortalidade apenas pelos conídios. No controle foi possível recuperar as larvas sobreviventes, demonstrando pela primeira vez um método para avaliar larvas crípticas, podendo testar outros ativos para controle de larvas de *S. levis* e outros insetos com desenvolvimento críptico.

4.2. Confirmação da colonização endofítica

A confirmação endofítica do fungo *B. bassiana* na planta de cana-de-açúcar foi demonstrada com amostragens de partes de folha, colmo em meio seletivo e de raiz com inoculação do fungo no solo próximo das raízes, em comparação com as plantas testemunha. Ficou demonstrado a formação de conídios na parte interna das porções vegetais amostradas nas plantas tratadas e a não ocorrência do fungo nas amostras da testemunha (Figura 13).

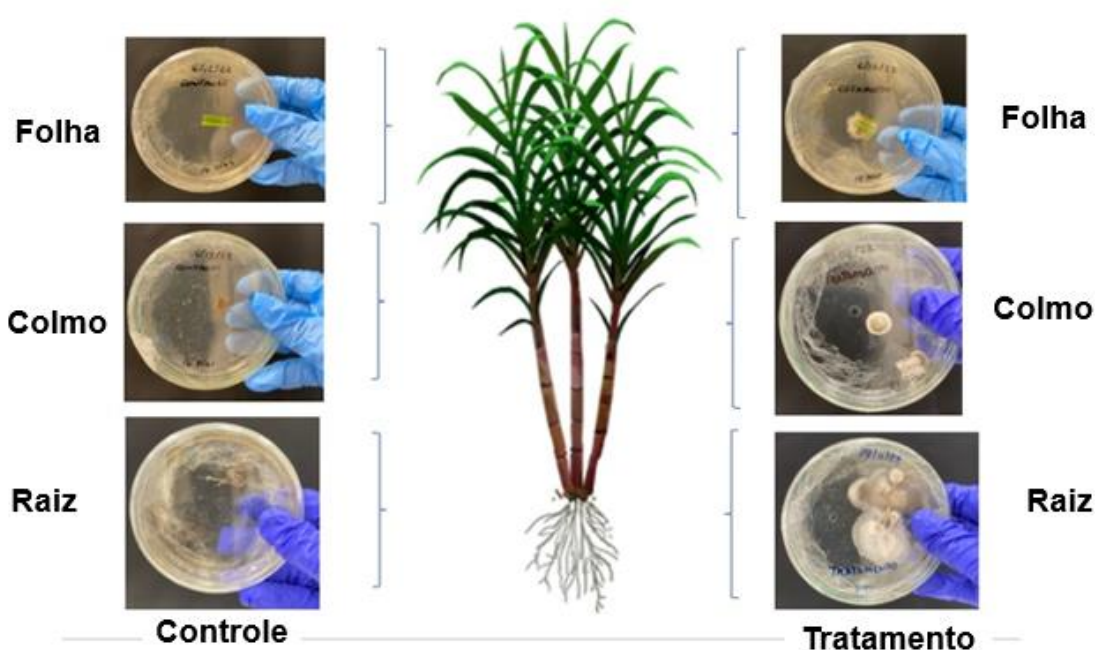


Figura 13 - Confirmação endofítica de amostras de folha, colmo e raiz de cana-de-açúcar inoculadas com *Beauveria bassiana* na concentração $1,6 \times 10^6$ conídios ML^{-1}

4.3. Avaliação comportamental do inseto aos voláteis das plantas

As respostas comportamentais de fêmeas de *S. levis* aos estímulos olfativos resultaram em uma preferência de 69,7% dos insetos em relação às plantas controle, enquanto apenas 30,3% preferiram as tratadas com *B. bassiana* na concentração de $1,6 \times 10^6$ conídios ml^{-1} aplicados via solo, com as plantas controle sendo 2,3 vezes mais atrativas do que as tratadas com o patógeno ($t = 4,64$; $df = 8$; $P = 0,0017$) (Figura 14 A).

4.4. Dano larval de *Sphenophorus levis* em mudas de cana-de-açúcar submetidas à colonização endofítica por *Beauveria bassiana*

A colonização por *B. bassiana* nas plantas de cana-de-açúcar afetou significativamente o dano causado pelas larvas de *S. levis* (Figura 15). Durante a abertura das plantas para avaliação dos danos, foi possível observar larvas parasitadas com o fungo nas plantas inoculadas com *B. bassiana* via solo, ele não sendo constatado nas avaliações das plantas controle (Figura 16 D, E e F). Dos muitos relatos de *B. bassiana* como um endófito vegetal com ação sobre o inseto fitófagos, poucos demonstraram evidências da micose nas larvas (Akello *et al.*, 2008).

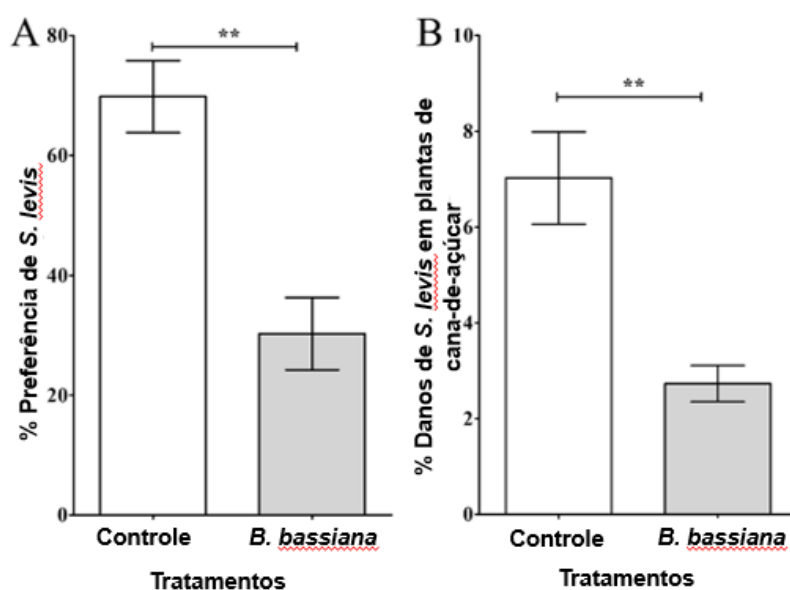


Figura 14 - A - Porcentagem de fêmeas de *Sphenophorus levis* repelidas pelas plantas de cana-de-açúcar submetidas a tratamento via solo com *Beauveria bassiana*; B - Porcentagem do dano larval de *S. levis* na seção longitudinal de mudas de cana-de-açúcar submetidas ou não à colonização endofítica por *B. bassiana*.

Médias diferem entre si pelo teste t (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$; $\alpha=0,05$).

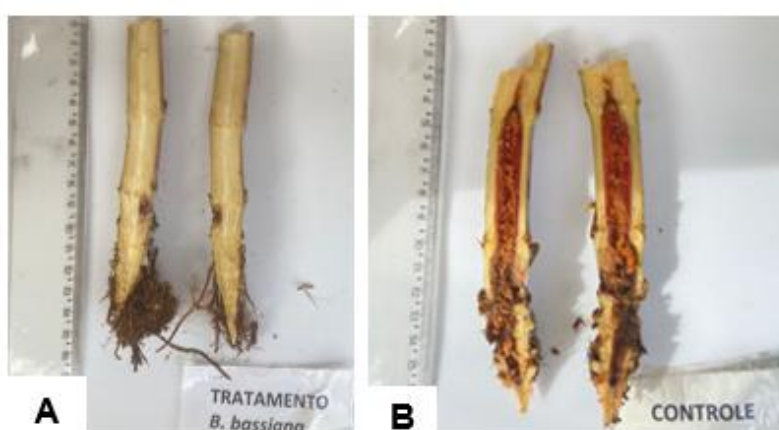


Figura 15 – Avaliação dos danos causados por larvas de *Sphenophorus levis* em plantas de cana-de-açúcar submetidas (A) ou não (B) à colonização endofítica por *Beauveria bassiana*.

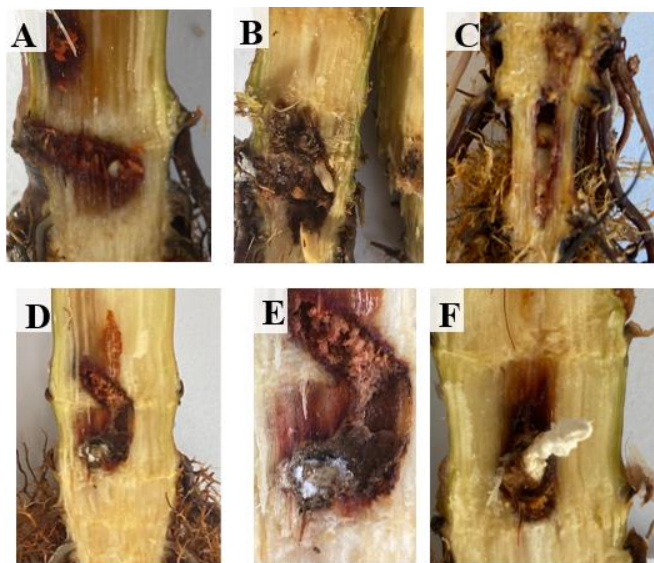


Figura 16 - Evidência da micose nas larvas de *Sphenophorus levis* causada por *Beauveria bassiana* inoculada via solo em plantas de cana-de-açúcar (D, E e F), em contraste com insetos saudáveis provenientes de plantas controle (A, B e C).

Em plantas inoculadas via solo, a porcentagem de danos foi de 2,73% (Figura 14 A), enquanto no controle foi de 7,27% ($t = 4,15$; $df = 12$; $P=0,0013$), com a colonização endofítica pelo patógeno reduzindo em 38,0% os danos provocados nas plantas (Figura 14 B).

5. DISCUSSÃO

Sphenophorus levis é uma importante praga da cana-de-açúcar, muito devido ao comportamento e habitat do inseto que dificulta a ação do controle, uma vez que o ciclo de vida é longo e complexo, com as larvas e pupas ocorrendo no interior das partes basais das plantas (Evangelista *et al.*, 2017).

Essa dificuldade imposta pelo hábito endofítico das larvas impede o desenvolvimento de pesquisas básicas para prospecção e produção de medidas de controle com ação direta sobre essa fase, pois a inexistência de metodologias de bioensaios específicos para larvas, faz com que as estratégias de controle não sejam testadas com efetividade nessa fase (“protegida”) do inseto. Por isso, protocolos de

métodos de bioensaios são pré-requisitos importantes para programas voltados ao controle de insetos-praga, pois têm como objetivo avaliar a eficácia e determinar gradiente de concentrações ou doses de produtos químicos em uma determinada população-teste (Mandava, 2018).

A disponibilidade de método padrão, validado e de fácil execução, é crucial para o monitoramento de novos inseticidas ou bioinseticidas ser bem-sucedido, sendo apresentado neste trabalho um método para determinação da concentração letal em larvas de *S. levis* tendo uma abordagem inédita e que pode ser replicável com possibilidade de se testar inseticidas em larvas de outros insetos com desenvolvimento similar (Hader e Erzinger, 2017).

Experimentos de inoculação artificial com *B. bassiana* em solo para seu estabelecimento artificial como endofítico foi evidenciado em diversas plantas cultivadas, com o estabelecimento do fungo afetando adversamente os insetos-praga, evidenciando potencial para utilização no manejo de pragas (Vega *et al.*, 2008; Vega *et al.*, 2009; Giannoulakis *et al.*, 2023). Sua ação pode se estender sistemicamente nos tecidos, atingindo os insetos que ficam protegidos no interior da planta (Wilberts *et al.*, 2023; Zhu *et al.*, 2023), com o presente estudo demonstrando que *B. bassiana* cepa IBCB 66 pode colonizar endofiticamente plantas de cana-de-açúcar, quando inoculada em solo, e afetar a fase larval de *S. levis*, influenciando no comportamento do inseto na busca pelo hospedeiro.

O fungo em colonização endofítica afetou significativamente a mortalidade das larvas de *S. levis*, com evidências da extrusão do fungo e redução significativa dos danos causados pelas larvas, o que pode ser explicado pelo fato de que o fungo pode ter afetado negativamente a alimentação e o desenvolvimento larval, resultando no controle das larvas, corroborando com as observações de Akello (2008), nas quais os autores citam que mudas de bananeiras inoculadas com uma suspensão de *B. bassiana*, via colonização endofítica, tiveram redução no dano causado por larvas de *C. sordidus* da ordem de 86,7%, persistindo por pelo menos 4 meses.

Da mesma forma, *B. bassiana* no interior de tecidos vegetais de palmeiras afetou a sobrevivência larval de *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae) (Ricaño *et al.*, 2013), assim como controlou a broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1876) (Coleoptera: Curculionidae) (Vega *et al.*,

2009), além de provocar 90,0 % de mortalidade larval de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) em plantas de tomate, *S. lycopersicum* (Silva *et al.*, 2020).

Pesquisas conduzidas por Barta (2018) demonstraram que *B. bassiana* endofítica reduziu a alimentação e a sobrevivência das larvas do bicho-mineiro da castanha-da-índia, *Cameraria ohridella* Deschka e Dimic, 1986 (Lepidoptera: Gracillariidae), enquanto Mutune (2016) citam redução significativa na alimentação da larva do caule do feijão, *Ophiomyia phaseoli* (Tryon, 1895) (Diptera: Agromizidae), e prejuízos significativos em sua oviposição.

Outra vantagem da colonização pelo fungo *B. bassiana* é a produção de metabólitos secundários que circulam nas plantas e desencadeiam defesa sistêmica induzida que, por sua vez, afetam a aptidão de herbívoros, podendo ainda impedir o inseto na busca pelo hospedeiro (Jha *et al.*, 2023; Pirttilä *et al.*, 2023; Zhu *et al.*, 2023). No presente estudo ficou comprovado que as fêmeas de *S. levis* são capazes de identificar plantas de cana-de-açúcar tratadas com *B. bassiana* evitando-as, revelando ser uma ferramenta útil para ser adicionada na proteção, por exemplo, de mudas-pré-brotadas em campo contra o ataque de *S. levis*.

A repelência dos adultos em relação às plantas tratadas com fungo pode ser atribuída a mecanismos de interação entre a planta e o fungo, um complexo processo, mediado por alterações metabólicas na planta colonizada, o que já foi confirmado por diversos estudos que relatam que no momento da colonização pelo fungo entomopatogênico o sistema de defesa da planta é ativado, assemelhando-se a uma infecção por fitopatógeno, com a produção de enzimas conhecidas como “biocatalisadores”, acarretando reações bioquímicas específicas com produção de metabólitos ativos para resistência (Wei *et al.*, 2020; Hu e Bidochka, 2021; Gupta *et al.*, 2022).

A colonização dos fungos entomopatogênicos pode alterar a qualidade nutricional das plantas colonizadas, como também modificar os perfis voláteis emitidos por elas, modulando as interações entre insetos e plantas, o que pode influenciar o tempo de desenvolvimento, a fecundidade, a localização do hospedeiro ou o comportamento de oviposição dos insetos herbívoros (Rondot e Reineke, 2017; Duffy *et al.*, 2018). A alteração no comportamento de seleção hospedeira é uma faceta crucial decorrente de alterações fisiológicas nas plantas após colonização endofítica

e produção de metabólitos secundários, o que afeta a interação herbívoro-planta, podendo auxiliar no manejo de pragas (Jensen *et al.*, 2020; Lozano-Soria *et al.*, 2020; Bamisile *et al.*, 2021; Quesada-Moraga *et al.*, 2022 Russo *et al.*, 2022; Samal *et al.*, 2023; Zhu *et al.*, 2023).

Há fortes evidências dos múltiplos papéis de *B. bassiana* como endofítico na proteção das plantas, porém esse mecanismo permanece obscuro e precisa ser melhor avaliado, pois a associação endofítica ainda deixa lacunas sobre as condições e seu desempenho quanto à variedade da planta, estado nutricional, características físico-químicas-microbianas do solo, isolado fúngico, sistema de aplicação do fungo, densidade do inóculo fúngico e condições ambientais (Jaber e Enkerli, 2016 e 2017; Ghosh *et al.*, 2020).

A estratégia utilizada neste trabalho demonstra o fungo *B. bassiana* como endofítico em plantas de cana-de-açúcar, o que pode ser considerado como uma alternativa promissora no controle de *S. levis*, visto que apresenta benefícios como menor custo, quando comparada com a estratégia de biocontrole inundativo, e que a aplicação via solo demanda menor volume de inóculo para promover a colonização do hospedeiro, além de proteger dos estresses abióticos ambientais, inferindo-se que tenha efeitos positivos sobre a persistência do fungo (Quesada Moraga, 2020). A abordagem aqui proposta para o controle de *S. levis* contribui para superação de obstáculos tradicionais que impedem a ampla disseminação e adoção do controle microbiano.

6. CONCLUSÃO

O potencial da associação do fungo entomopatogênico em colonização endofítica na cana-de-açúcar e seu efeito sobre *S. levis* foram revelados nesse estudo, o que resultou no controle da fase larval e proteção da planta. A inoculação de *B. bassiana* em plantas de cana-de-açúcar reduziu o dano e a preferência de *S. levis*, revelando pela primeira vez que a aplicação do fungo entomopatogênico via solo atingiu o estágio larval do inseto (negativamente), demonstrando o grande potencial da estratégia para o manejo da praga.

7. REFERÊNCIAS

- Agbessenou A, Akutse KS, Yusuf AA, Ekesi S, Subramanian S, Khamis FM (2020) Endophytic fungi protect tomato and nightshade plants against *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) through a hidden friendship and cryptic battle. **Scientific Reports** 10(1):1-13.
- Akello J, Dubois T, Coyne D, Kyamanywa S (2008) Endophytic *Beauveria bassiana* in banana (*Musa* spp.) reduces banana weevil (*Cosmopolites sordidus*) fitness and damage. **Crop Protection** 27(11):1437-1441.
- Akram S, Ahmed A, He P, He P, Liu Y, Wu Y, He Y (2023) Uniting the role of endophytic fungi against plant pathogens and their interaction. **Journal of Fungi** 9(1):72.
- Alencar JRCC (2016) **Dinâmica populacional, distribuição espacial e plano de amostragem sequencial de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar.** 68 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Entomologia Agrícola), Unesp, Jaboticabal.
- Alkhoury C (2021) Can colonization by an endophytic fungus transform a plant into a challenging host for insect herbivores? **Fungal Biology** 125(12):1009-1016.
- Almeida JEM (2019) Microbial control of sugarcane pests. In: Souza B, Vásquez LL, Marucci RC (Eds.) **Natural enemies of insect pests in neotropical agroecosystems.** New York: Springer, p. 427-436.
- Altaf N, Ullah MI, Afzal M, Arshad M, Ali S, Rizwan M, Shuraym LAA, Alhelaify SS, Sayed S (2023) Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in maize plants affects the fitness of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Microorganisms** 11(4):1067.
- Alves SB, Leite LG, Batista Filho A, Almeida JEM, Marques EJ (1998) Produção massal de fungos entomopatogênicos na América Latina. In: Alves SB, Lopes RB (Eds.) **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios.** Piracicaba: Fealq, p. 215-238.
- Andreato C, Gazaffi R, Oliveira MMA, Camargo LEA, Urashima AS (2022) Effect of thermotherapy, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* titers, sugarcane genotype, and diagnostic techniques on ratoon stunt control in Brazil. **Journal of Applied Microbiology** 133(3):1-12.
- Antunes FA, Chandel AK, Terán-Hilares R, Milessi TS, Travalía BM, Ferrari FA, Silva SSD (2019) Biofuel production from sugarcane in Brazil. In: Khan M, Khan I (Eds.) **Sugarcane biofuels.** Cham: Springer. p. 99-121.
- Arrigoni EB, Precetti AACM, Almeida LC, Kasten Júnior P (1988) Metodologia de levantamento de pragas de solo em cana-de-açúcar. In: IV **Seminário de Tecnologia Agrônômica.** Piracicaba, São Paulo. p. 647-653.
- Bamisile BS, Siddiqui JA, Akutse KS, Ramos Aguila LC, Xu Y (2021) General limitations to endophytic entomopathogenic fungi use as plant growth promoters, pests and pathogens biocontrol agents. **Plants** 10(10):2119.

Barbosa Júnior MR, Moreira BRDA, Brito Filho ALD, Tedesco D, Shiratsuchi LS, Silva RPD (2022) UAVs to monitor and manage sugarcane: integrative review. **Agronomy** 12(3):661.

Barra-Bucarei L, González MG, Iglesias AF, Aguayo GS, Peñalosa MG, Vera PV (2020) *Beauveria bassiana* multifunction as an endophyte: growth promotion and biologic control of *Trialeurodes vaporariorum*, (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) in tomato. **Insects** 11(9):591.

Barta M (2018) In planta bioassay on the effects of endophytic *Beauveria* strains against larvae of horse-chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella*). **Biological Control** 121:88-98.

Behie SW, Bidochka MJ (2014) Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. **Applied and Environmental Microbiology** 80(5):1553-1560.

Behie SW, Jones SJ, Bidochka MJ (2015) Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. **Fungal Ecology** 13:112-119.

Behie SW, Moreira CC, Sementchoukova I, Barelli L, Zelisko PM, Bidochka MJ (2017) Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. **Nature Communications** 8(1):14245.

Bharadwaj A (2024) Influence of endophytes on plant growth and abiotic stress. In: Egamberdieva D, Parray JA, Davranov K. (Eds.) **Plant endophytes and secondary metabolites**. Cambridge: Academic Press. p. 159-174.

Bueno VHP, Parra JRP, Bettiol W, van Lenteren JC (2020). Biological control in Brazil. In: van Lenteren JC, Bueno VH, Luna MG, Colmenarez Y (Eds.) **Biological control in Latin America and the Caribbean: its rich history and bright future**. Wallingford: CABI. p. 78-107.

Campanini, E. B., Davolos, C. C., Alves, E. C. D. C., & Lemos, M. V. F. (2012). Caracterização de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de importantes insetos-praga da agricultura. **Bragantia**, 71: 362-369.

Canassa F (2014) **Distribuição espacial, efeito do manejo da palha pós-colheita e da aplicação de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae) na ocorrência de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae)**. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Entomologia), ESALQ, USP, Piracicaba.

Canassa F, Tall S, Moral RA, Lara IA, Delalibera Júnior I, Meyling NV (2019) Effects of bean seed treatment by the entomopathogenic fungi *Metarhizium robertsii* and *Beauveria bassiana* on plant growth, spider mite populations and behavior of predatory mites. **Biological Control** 132:199-208.

Carbonari CA, Matos AKA, Brito IPFS, Velini ED, Dayan FE (2020) Impact of green cane harvesting on pest management in sugarcane. **Outlooks on Pest Management** 31(2):64-73.

Castilho VT, Ferreira CP, Fernandes OA (2022) Um olhar sobre a distribuição espaço-temporal de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae). **Proceeding Series of the Brazilian Society of Computational and Applied Mathematics** 9(1):010200-1 - 010200-2.

Castro SGQ, Dinardo-Miranda LL, Fracasso JV, Bordonal RO, Menandro LMS, Franco HCJ, Carvalho JLN (2019) Changes in soil pest populations caused by sugarcane straw removal in Brazil. **BioEnergy Research** 12:878-887.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar. Safra 2022/23 - Segundo Levantamento. Brasília. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cana>>. Acesso em: 27 jan. 2023.

Dara SK (2019). Non-entomopathogenic roles of entomopathogenic fungi in promoting plant health and growth. **Insects** 10(9):277.

Darsouei R, Karimi J, Stelinski LL (2024) Endophytic colonization of sugar beet by *Beauveria varroae* and *Beauveria bassiana* reduces performance and host preference in army worm, *Spodoptera littoralis*. **Crop Protection** 175:106441.

De Bortoli CP (2018) **The investigation of factors potentially involved in resistance to *Bacillus thuringiensis* in native *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) populations.** 107 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Entomologia Agrícola, FCAV, Unesp, Jaboticabal).

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** 22(6):553-558.

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

Deshmukh L, Sandhu SS (2024) Entomopathogenic fungi: a boon towards organic life support management. In: Singh SK, Kumar D, Shamim M, Sharma R (Eds.) **Applied mycology for agriculture and foods: industrial applications.** Cambridge: Academic Press. p. 97-128.

Dinardo-Miranda LL (2000) Ocorrência de *Sphenophorus levis* em 2000. **Stab** 19:26.

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

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

Dinardo-Miranda LL, Fracasso JV, Cabral SB, Valério W, Gonçalves RD, Beltrame JA (2006). Eficiência de inseticidas aplicados em soqueiras de cana-de-açúcar no controle de *Sphenophorus levis*. **Stab** 24:34-37.

Donga TK, Vega FE, Klingent I (2018) Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as an endophyte in sugarcane, *Saccharum officinarum*. **Fungal Ecology** 35:70-77.

Duffy AG, Hughes GP, Ginzel MD, Richmond DS (2018) Sinais químicos voláteis e de contato associados ao comportamento de reconhecimento de hospedeiro e parceiro de *Sphenophorus venatus* e *Sphenophorus parvulus* (Coleoptera: Dryophthoridae). **Revista de Ecologia Química** 44(6):556-564.

Evangelista EFD, Serpa-dos-Santos L, Simone-Zera F, Cruz BRG Controle químico e biológico de *Sphenophorus levis* Vaurie (Coleoptera: Curculionidae) na cultura da cana-de-açúcar. **Entomologia Mexicana** 4:347-352.

FAO. Food and Agriculture Organization. Food safety risk analysis. A guide for national food safety authorities. Rome: FAO 2023. Disponível em:<<https://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/fr/c/1636518/>>. Acesso em: 22 nov. 2023.

Gange AC, Dey S, Currie AF, Sutton BC (2007) Site-and species-specific differences in endophyte occurrence in two herbaceous plants. **Journal of Ecology** 95(4):614-622.

Ghorai S (2023) Endophytic fungi: a tool for managing abiotic stress in plants. In: Desai NM, Patil M, Pawar UR (Eds.) **Plant metabolites under environmental stress: mechanisms, responses, and adaptation strategies**. Cham: Academic Press. p. 1-24.

Ghosh SK, Chaudhary M, Manjunatha N (2020) Endophytes: a potential bio-agent for the plant protection. In: Chakravarthy A (Ed.) **Innovative pest management approaches for the 21st century: harnessing automated unmanned technologies**. Berlin: Springer. p. 273-297.

Giannoulakis E, Mantzoukas S, Lagogiannis I, Dervisoglou S, Perdakis D (2023) Efficacy of endophytic wild strains of entomopathogenic fungi against the tomato leafminer *Tuta absoluta* Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in tomato plants. **Egyptian Journal of Biological Pest Control** 33(1):19.

Goble T, Almeida J, Conlong D (2017) Microbial control of sugarcane insect pests. In: Lacey L (Eds.) **Microbial control of insect and mite pests**. Cambridge: Academic Press. p. 299-312.

Gupta R, Keppanan R, Leibman-Markus M, Rav-David D, Elad Y, Ment D, Bar M (2022) The entomopathogenic fungi *Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* promote systemic immunity and confer resistance to a broad range of pests and pathogens in tomato. **Phytopathology** 112(4):784-793.

Hu S, Bidochka MJ (2021) Root colonization by endophytic insect-pathogenic fungi. **Journal of Applied Microbiology** 130(2):570-581.

Hader, D., & Erzinger, G. (Eds.). (2017). **Bioassays: advanced methods and applications**. Elsevier.

Huarte-Bonnet C, Paixao FR, Ponce JC, Santana M, Prieto ED, Pedrini N (2018) Alkane-grown *Beauveria bassiana* produce mycelial pellets displaying peroxisome

proliferation, oxidative stress, and cell surface alterations. **Fungal Biology** 122(6):457-464.

Humber RA (1997). Fungi: identification. In: Lacey LA (Ed.) **Manual of techniques in insect pathology**. San Diego: Academic Press. p. 153-185.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2023. Disponível em:<<https://genciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/38074-em-setembro-ibge-preve-safra-recorde-de-318-1-milhoes-de-toneladas-para-2023>>. Acesso em: 23 nov. 2023.

Jaber LR, Enkerli J (2016) Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. **Biological Control** 103:187-195.

Jaber LR, Enkerli J (2017) Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth? **Biocontrol Science and Technology** 27(1):28-41.

Jaber LR, Ownley BH (2018) Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? **Biological Control** 116:36-45.

Jensen RE, Cabral C, Enkegaard A, Steenberg T (2020) Influence of the plant interacting entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on parasitoid host choice-behavior, development, and plant defense pathways. **PLOS ONE** 15(9): e0238943.

Jha P, Kaur T, Panja A, Paul S, Kumar V, Malik T (2023) Endophytic fungi: hidden treasure chest of antimicrobial metabolites interrelationship of endophytes and metabolites. **Frontiers in Microbiology** 14:1227830

Kasambala Donga T, Meadow R, Meyling NV, Klingen I (2021) Natural occurrence of entomopathogenic fungi as endophytes of sugarcane (*Saccharum officinarum*) and in soil of sugarcane fields. **Insects** 12(2):160.

Lacerda ARS, Souza AR, Santos TM, Clemente JM, Duarte AR, Machado MG (2019) Produtividade da cana-de-açúcar em resposta a adubação NPK em diferentes épocas. **Humanidades e Tecnologia** 18(1):45-51.

Landa BB, López-Díaz C, Jiménez-Fernández D, Montes-Borrego M, Muñoz-Ledesma FJ, Ortiz-Urquiza A, Quesada-Moraga E (2013) In-plant detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new-developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. **Journal of Invertebrate Pathology** 114(2):128-138.

Leite LG, Chacon-Orozco JG, Shapiro-Ilan DI, Baldo FB, Cardoso JF (2023) Effects of temperature for optimizing production and storage of *Steinernema rarum* in a novel biphasic process, and efficacy of the nematode against *Sphenophorus levis*. **Biological Control** 187:105381.

Li YR (2023) Growth and development of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) and its relationship with environmental factors. In: Li YR, Rao GP (Eds.) **Agro-industrial perspectives on sugarcane production under environmental stress**. Berlin: Springer. p. 1-11.

Lozano-Soria A, Picciotti U, Lopez-Moya F, Lopez-Cepero J, Porcelli F, Lopez-Llorca LV (2020) Volatile organic compounds from entomopathogenic and nematophagous fungi, repel banana black weevil (*Cosmopolites sordidus*). **Insects** 11(8):509.

Mandava, N. B. (2018). **Handbook of Natural Pesticides: Methods**: Volume I: Theory, Practice, and Detection. Crc Press.

Mann AJ, Davis TS (2020) Plant secondary metabolites and low temperature are the major limiting factors for *Beauveria bassiana* (Bals. - Criv.) Vuill. (Ascomycota: Hypocreales) growth and virulence in a bark beetle system. **Biological Control** 141:104130.

Mantovani GL (2023) **Estudo da eficiência das táticas de manejo integrado de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em soqueiras de cana-de-açúcar**. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Entomologia), ESALQ, USP, Piracicaba.

Mantzoukas S, Eliopoulos PA (2020) Endophytic entomopathogenic fungi: a valuable biological control tool against plant pests. **Applied Sciences** 10(1):360.

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

Mascarin GM, Jaronski ST (2016) The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 32:1-26.

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

Matušinsky P, Florová V, Sedláková B, Mičoch P, Bleša D (2024) Colonization dynamic and distribution of the endophytic fungus *Microdochium bolleyi* in plants measured by qPCR. **PLOS ONE** 19(1):e0297633.

McKinnon AC, Glare TR, Ridgway HJ, Mendoza-Mendoza A, Holyoake A, Godsoe WK, Bufford JL (2018) Detection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the rhizosphere of wound-stressed *Zea mays* plants. **Frontiers in Microbiology** 9:1161.

Meyling NV, Eilenberg J (2006) Isolation and characterization of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. **Mycological Research** 110(2):188-195.

Moore PH, Botha FC (2013) **Sugarcane**: physiology, biochemistry and functional biology. New York: John Wiley & Sons. 716p.

Moraes GC, Ávila CJ (2014) Insetos-praga associados ao solo na cultura da cana-de-açúcar, no estado de Mato Grosso do Sul. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste. 37p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 66)

Mutune B, Ekesi S, Niassy S, Matiru V, Bii C, Maniania NK (2016) Fungal endophytes as promising tools for the management of bean stem maggot *Ophiomyia phaseoli* on beans *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Pest Science** 89:993-1001.

Noronha RHF, Oliveira MF, Mendes AL, Damasceno AF, Zerbato C, Furlani CEA (2019) Application of signal correction for *Sphenophorus levis* control and higher quality production in mechanized harvesting of sugarcane ratoon. **Australian Journal of Crop Science** 13(12):1936-1942.

Otto R, Machado BA, Silva ACM, Castro SGQ, Lisboa IP (2022) Sugarcane pre-sprouted seedlings: a novel method for sugarcane establishment. **Field Crops Research** 275:108336.

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

Parra JRP (2023) Biological Control in Brazil: state of art and perspectives. **Scientia Agricola** 80: e20230080.

Parra JRP, Coelho Júnior A (2019) Applied biological control in Brazil: from laboratory assays to field application. **Journal of Insect Science** 19(2):5.

Parra JRP, Coelho Júnior A (2022) Insect rearing techniques for biological control programs, a component of sustainable agriculture in Brazil. **Insects** 13(1):105.

Parsi F, Ashnaei SP, Khaneghah SS (2023) Screening and virulence of Iranian isolates of *Beauveria bassiana* for potential management of sunn pest (*Eurygaster integriceps* Puton) in relation to cold activity. **Italian Journal of Mycology** 52:17-21.

Parveen SS, Rashtrapal PS (2024) Integrated pest management strategies using endophytic entomopathogenic fungi. **Plant Science Today** 11(1):568-574.

Pavarini GMP, Demonari CG, Pavarini R, Souza IV (2018) Atração de adultos de *Cosmopolites sordidus* e *Metamasius* sp. (Coleoptera: Curculionidae) por armadilhas associadas a inseticida e proteína hidrolisada. **Revista Cultura Agronômica** 27(1):148-159.

Pavlu FA, Molin JP (2016) A sampling plan and spatial distribution for site-specific control of *Sphenophorus levis* in sugarcane. **Acta Scientiarum. Agronomy** 38(3):279-287.

Pereira DGS, Santos LAO (2022) Revisão de literatura: uso de *Beauveria bassiana* no controle Biológico de *Sphenophorus levis* Vaurie 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar. In: Silva AP (Org.) **Manejo de pragas e doenças** - a busca por formas sustentáveis de controle. São Paulo: Editora Científica Digital. p. 133-150.

Pinto AS, Garcia JF, Oliveira HN (2006) Manejo das principais pragas da cana-de-açúcar. In: Segato SV, Pinto AS, Jendiroba E, Nóbrega JCM (Orgs.) **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP2. p. 257-280.

Pirttilä AM, Brusila V, Koskimäki JJ, Wäli PR, Ruotsalainen AL, Mutanen M, Markkola AM (2023) Exchange of microbiomes in plant-insect herbivore interactions. **mBio** 14(2): e03210-22.

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

Precetti AACM, Precetti FO, Wiendl FM, Sgrillo RB (1983) Studies on the dispersal of *Sphenophorus levis* vaurie, 1978 (Col. Curculionidae) adults in sugar cane by the use of radioactive tracer. São Paulo: **Copersucar**. 23p. (Boletim Técnico)

Proietti S, Falconieri GS, Bertini L, Pascale A, Bizzarri E, Morales-Sanfrutos J, Sabidó N, Ruocco M, Monti MM, Russo A, Diziurca K, Ceci M, Loreto F, Caruso C (2023) *Beauveria bassiana* rewires molecular mechanisms related to growth and defense in tomato. **Journal of Experimental Botany** 74(14):4225-4243.

Qin X, Zhao X, Huang S, Deng J, Li X, Luo Z, Zhang Y (2021) Pest management via endophytic colonization of tobacco seedlings by the insect fungal pathogen *Beauveria bassiana*. **Pest Management Science** 77(4):2007-2018.

Quesada Moraga E (2020) Entomopathogenic fungi as endophytes: their broader contribution to IPM and crop production. **Biocontrol Science and Technology** 30(9):864-877.

Quesada-Moraga E, Garrido-Jurado I, Yousef M, González-Mas N (2022) Multitrophic interactions of entomopathogenic fungi in BioControl. **BioControl** 67(5):457-472.

Quesada-Moraga E, Landa BB, Muñoz-Ledesma J, Jiménez-Díaz RM, Santiago-Alvarez C (2006) Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. **Mycopathologia** 161:323-329.

Quesada-Moraga E, López-Díaz C, Landa BB (2014) The hidden habit of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: first demonstration of vertical plant transmission. **PLOS ONE** 9(2):e89278.

R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Reis JBA, Lorenzi AS, Vale HMM (2022) Methods used for the study of endophytic fungi: a review on methodologies and challenges, and associated tips. **Archives of Microbiology** 204(11):675.

Ricaño J, Güerri-Agulló B, Serna-Sarriás MJ, Rubio-Llorca G, Asensio L, Barranco P, Lopez-Llorca LV (2013) Evaluation of the pathogenicity of multiple isolates of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) on *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae) for the assessment of a solid formulation under simulated field conditions. **Florida Entomologist** 96(4):1311-1324.

Ríos-Moreno A, Garrido-Jurado I, Resquín-Romero G, Arroyo-Manzanares N, Arce L, Quesada-Moraga E (2016) Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*. **Biocontrol Science and Technology** 26(11):1574-1585.

Rondot Y, Reineke A (2017) Association of *Beauveria bassiana* with grapevine plants deters adult black vine weevils, *Otiorhynchus sulcatus*. **Biocontrol Science and Technology** 27(7): 811-820.

Rondot Y, Reineke A (2018) Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. **Biological Control** 116:82-89.

Rosa JO, Soares JRS, Fernandes OA (2024) Harvest load transfer sites influence sugarcane billbug (Coleoptera: Curculionidae) spatiotemporal injury in sugarcane. **Pest Management Science** 80(4):1771-1778.

Russo A, Pollastri S, Ruocco M, Monti MM, Loreto F (2022) Volatile organic compounds in the interaction between plants and beneficial microorganisms. **Journal of Plant Interactions** 17(1):840-852.

Sain SK, Monga D, Kumar R, Nagrale DT, Hiremani NS, Kranthi S (2019) Compatibility of entomopathogenic fungi with insecticides and their efficacy for IPM of *Bemisia tabaci* in cotton. **Journal of Pesticide Science** 44(2):97-105.

Sala A, Vittone S, Barrena R, Sanchez A, Artola A (2021) Scanning agro-industrial wastes as substrates for fungal biopesticide production: use of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. **Journal of Environmental Management** 295:113113.

Samal I, Bhoi TK, Majhi PK, Murmu S, Pradhan AK, Kumar D, Balawi TA (2023) Combatting insects mediated biotic stress through plant associated endophytic entomopathogenic fungi in horticultural crops. **Frontiers in Plant Science** 13:1098673.

Sánchez-Rodríguez AR, Raya-Díaz S, Zamarreño ÁM, García-Mina JM, del Campillo MC, Quesada-Moraga E (2018) An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae. **Biological Control** 116:90-102.

Sanghera GS (2021) Strategies to enhance input use efficiency and productivity of sugarcane through precision agriculture. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** 10(6):774-801.

Santos LS, Braga NCC, Rodrigues TM, Rubio Neto A, Brito MF, Severiano EC (2020) Pre-sprouted seedlings of sugarcane using sugarcane industry by-products as substrate. **Sugar Tech** 22(4):675-685.

Shadmani L, Jamali S, Fatemi A (2021) Isolation, identification, and characterization of cadmium-tolerant endophytic fungi isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.) roots and their role in enhancing phytoremediation. **Brazilian Journal of Microbiology** 52:1097-1106.

Shahid M, Haq E, Mohamed A, Rizvi PQ, Kolanthasamy E (2023) Entomopathogen-based biopesticides: insights into unraveling their potential in insect pest management. **Frontiers in Microbiology** 14:1208237.

Shapiro-Ilan D, Arthurs SP, Lacey LA (2017) Microbial control of arthropod pests of orchards in temperate climates. In: Lacey L (Ed.) **Microbial control of insect and mite pests**. Cambridge: Academic Press. p. 253-267.

Sharma S, Shera PS, Kaur R, Sangha KS (2020) Evaluation of augmentative biological control strategy against major borer insect pests of sugarcane - a large-scale field appraisal. **Egyptian Journal of Biological Pest Control** 30:1-10.

Silva ACL, Silva GA, Abib PHN, Carolino AT, Samuels RI (2020) Endophytic colonization of tomato plants by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for controlling the south american tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **CABI Agriculture and Bioscience** 1:1-9.

Silva GS, Silva AFM, Giraldeli AL, Ghirardello GA, Victória Filho R, Toledo REB (2018) Weed management in pre-sprouted seedlings system of sugarcane. **Revista Brasileira de Herbicidas** 17(1):86-94.

Silva MSO, Cardoso JFM, Ferreira MEP, Baldo FB, Silva RSA, Chacon-Orozco JG, Leite LG (2021) An assessment of *Steinernema rarum* as a biocontrol agent in sugarcane with focus on *Sphenophorus levis*, host-finding ability, compatibility with vinasse and field efficacy. **Agriculture** 11(6):500.

Singh Y, Choudhary RL, Chaudhary A, More N, Singh NP (2021) Impact of conservation agriculture and residue management on soil properties under sugarcane-based cropping systems. In: Jayaraman S, Dalal RC, Patra AK, Chaudhari SK (Eds.) **Conservation Agriculture: A Sustainable Approach for Soil Health and Food Security**. Singapore: Springer. p. 239-266.

Souza LS, Borges AL, Rezende JO (1994) Influência da correção e do preparo do solo sobre algumas propriedades químicas do solo cultivado com bananeiras. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, **Anais...** Petrolina: EMBRAPA:CPATSA. p. 3-4.

Sui L, Lu Y, Zhu H, Wan T, Li Q, Zhang Z (2022) Endophytic blastospores of *Beauveria bassiana* provide high resistance against plant disease caused by *Botrytis cinerea*. **Fungal Biology** 126(8):528-533.

Swathy K, Parmar MK, Vivekanandhan P (2024) Biocontrol efficacy of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* conidia against agricultural insect pests. **Environmental Quality Management**. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/tqem.22174>>. Acesso em: 27 mar. 2024.

Tan X, Zhang X, Yu M, Yu Y, Guo Z, Gong T, Niu S, Qin J, Zou Z, Ding G (2019) Sesquiterpenoids and mycotoxin swainsonine from the locoweed endophytic fungus *Alternaria oxytropis*. **Phytochemistry** 164:154-161.

UDOP. União dos Produtores de Bioenergia. Evolução da produtividade cana-de-açúcar safras 2022 a 2023. Disponível em: <https://www.udop.com.br/download/estatistica/institucional_economia/13fev20_analise_comparativa_desempenho_safras_2019a2020_e_2018a2019_dados_acumulados.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2023.

Van Lenteren JC, Bueno VH, Luna MG, Colmenarez Y (Eds.) (2019) **Biological control in Latin America and the Caribbean: its rich history and bright future**. Wellingford: CABI. p. 78-107.

Vandenberghe LPS, Valladares-Diestra KK, Bittencourt GA, Torres LZ, Vieira S, Karp SG, Soccol CR (2022) Beyond sugar and ethanol: the future of sugarcane biorefineries in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 167:112721.

Vaurie P (1978) Revision of the genus *Sphenophorus* in South America. **American Museum Novitates** 2659:1-30.

Vega FE (2018) The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. **Mycologia** 110(1):4-30.

Vega FE 2008 Insect pathology and fungal endophytes. **Journal of Invertebrate Pathology** 98(3):277-279.

Vega FE, Infante F, Castillo A, Jaramillo J. (2009) The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recent findings and future research directions. **Terrestrial Arthropod Reviews** 2(2):129.

Vega FE, Posada F, Aime MC, Pava-Ripoll M, Infante F, Rehner SA (2008) Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control** 46(1):72-82.

Verma J, Kumar C, Sharma M, Shukla AC, Saxena S (2024). Exploitation of microbial consortia for formulating biofungicides, biopesticides, and biofertilizers for plant growth promotion. In: Shukla AC (Eds) **Entrepreneurship with Microorganisms**. Berlin: Academic Press. p.227-257.

Vidal S, Jaber LR (2015) Entomopathogenic fungi as endophytes: plant–endophyte–herbivore interactions and prospects for use in biological control. **Current Science** 109(1):46-54.

Vinha FB, Delfanti, LAA, Pagliarani VD, Ferreira VS, Pinto AS (2020) Entomopathogenic fungi on the control of *Sphenophorus levis* in sugarcane crop. **Scientia Agraria Paranaensis** 19(3):280-288.

Vreysen MJB (2021) Monitoring sterile and wild insects in area-wide integrated pest management programmes. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson A (Eds.) **Sterile Insect Technique - Principles and practice in area-wide integrated pest management**. p. 485-528.

Wadt, L. Morfometria, amostragem populacional e reinvestigação do feromônio de *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae). **Piracicaba**, p. 1-22, 2016.

Wagner BL, Lewis VC (2000) Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology** 66(8):3468-3473.

Wang Y, Yu N, Chu F, Korai SK, Liu Z (2018) Sublethal effects of *Beauveria bassiana* sensu lato isolate NJBb2101 on biological fitness and insecticide sensitivity of parental and offspring generations of brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Biological Control** 121:44-49.

Wei QY, Li YY, Xu C, Wu YX, Zhang YR, Liu H (2020) Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* increases the resistance of tomatoes against *Bemisia tabaci*. **Arthropod-Plant Interactions** 14(3):289-300.

Wilberts L, Rojas-Preciado N, Jacquemyn H, Lievens B (2023). Fungal strain and crop cultivar affect growth of sweet pepper plants after root inoculation with entomopathogenic fungi. **Frontiers in Plant Science** 14:1196765.

Xavier GG (2020) **Níveis de dano econômico para o controle químico e biológico de *Sphenophorus levis* em cultivos de cana-de-açúcar de sequeiro e irrigado**. 23 f. Dissertação (Mestrado em Defesa Sanitária Vegetal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Zaman S, Ahmad F, Javed N (2020) Pathogenicity of entomopathogenic fungi against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) under abiotic factors. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences** 57(1):220303052.

Zhang BQ, Yang LT, Li YR (2015) Physiological and biochemical characteristics related to cold resistance in sugarcane. **Sugar Tech** 17:49-58.

Zhang MD, Wu SY, Yan JJ, Reitz S, Gao YL (2023) Establishment of *Beauveria bassiana* as a fungal endophyte in potato plants and its virulence against potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Insect Science** 30(1):197-207.

Zhang Z, Lu Y, Xu W, Sui L, Du Q, Wang Y, Li Q (2020) Influence of genetic diversity of seventeen *Beauveria bassiana* isolates from different hosts on virulence by comparative genomics. **BMC Genomics** 21:1-12.

Zhu H, Fu J, Wang H, Bidochka MJ, Duan M, Xu W, Ren SB, Zhang Z (2023) Fitness consequences of oviposition choice by an herbivorous insect on a host plant colonized by an endophytic entomopathogenic fungus. **Journal of Pest Science** 96(2):745-758.