



Prospecção de fungos endofíticos, edáficos e bioformulações para o controle de *Sphenophorus levis* VAURIE, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) na cultura da cana-de-açúcar

Raquel Moraes Costa Pereira

Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio

Prospecção de fungos endofíticos, edáficos e bioformulações para o controle de
***Sphenophorus levis* VAURIE, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) na**
cultura da cana-de-açúcar

Raquel Moraes Costa Pereira

Tese apresentada para exame de defesa para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

São Paulo
2024

Raquel Moraes Costa Pereira

**Prospecção de fungos endofíticos, edáficos e bioformulações para o controle de
Sphenophorus levis VAURIE, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) na
cultura da cana-de-açúcar**

Tese apresentada para exame de defesa para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

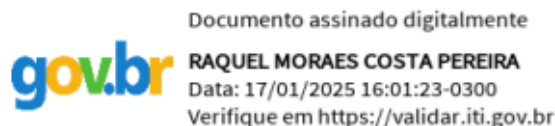
Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Orientador: Professor Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida

**São Paulo
2024**

Eu, **Raquel Moraes Costa Pereira**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico, de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela internet desde que citada a fonte.

Assinatura:



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Pereira, Raquel Moraes Costa.

Prospecção de fungos endofíticos, edáficos e bioformulações para o controle de *Sphenophorus levis* VAURIE, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) na cultura da cana-de-açúcar. / Raquel Moraes Costa Pereira - São Paulo, 2024.

174 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2024T.RP03

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: José Eduardo Marcondes de Almeida

Versão do título para o inglês: Prospecção of endophytic and edaphic fungi and bioformulations for the control of *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) in sugarcane (*Saccharum officinarum*) cultivation.

1. Blastosporos 2. Fermentação líquida submersa 3. Biorreator 4. Bateladas
I. Pereira, Raquel Moraes Costa II. Almeida, José Eduardo Marcondes de III.
Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2024/03

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Raquel Moraes Costa Pereira

Título: Prospecção de fungos endofíticos, edáficos e bioformulações para o controle de *Sphenophorus levis* VAURIE, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) na cultura da cana-de-açúcar

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para defesa e obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovada em: 18/12/2024

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida Instituição: Instituto Biológico/APTA
Julgamento: Aprovada Assinatura: abaixo

Prof. Dr. Mário Eidi Sato Instituição: Instituto Biológico/APTA
Julgamento: Aprovada Assinatura: abaixo

Prof. Dr. Miguel Francisco Souza Filho Instituição: Instituto Biológico/APTA
Julgamento: Aprovada Assinatura: abaixo

Prof. Dr. Sérgio Vicente Azevedo Instituição: IFSP/Barretos-SP
Julgamento: Aprovada Assinatura: abaixo

Prof. Dr. Luis Francisco Angeli Alves Instituição: Unioeste/Cascavel-PR
Julgamento: Aprovada Assinatura: abaixo

Prof. Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida - CAPSA - Instituto Biológico

Prof. Dr. Mario Eidi Sato - Instituto Biológico

Prof. Dr. Miguel Francisco Souza Filho - Instituto Biológico

Prof. Dr. Luis Francisco Angeli Alves - Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Sergio Vicente de Azevedo - Instituto Federal de São Paulo

Documento assinado digitalmente
gov.br LUIS FRANCISCO ANGELI ALVES
Data: 18/12/2024 14:25:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DEDICATÓRIA

Dedico,

À Mente Superior e onipotente que conheço como Deus, à minha mãe Helena Olímpia, ao meu esposo Alexandre Roberto e ao meu orientador Dr. José Eduardo.

*“Mas aqueles que esperam no Senhor renovam as suas
forças. Voam alto como águias; correm e não ficam
exaustos, andam e não se cansam.”*

Isaías 40:31

*“Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se
transforma...”*

Antoine Lavoisier

*“O problema imaginado por minha mente foi solucionado
pelo céu luminoso do Brasil.”*

Albert Einstein

*“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei
nos ombros de gigantes.”*

Isaac Newton

*“ Não andeis ansiosos por coisa alguma, mas em tudo, pela
oração e súplicas, e com ação de graças,
apresentem seus pedidos a Deus.”*

Filipenses 4:6

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus em primeiro lugar!

Ao Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida, por aceitar ser meu orientador, por sua atenção e paciência como professor, pela confiança e ensinamentos como pesquisador, por inspirar e estimular o meu desenvolvimento profissional no controle biológico de pragas de forma multidisciplinar, íntegra e dinâmica.

À minha família e amigos, pelo apoio e por acreditarem na minha capacidade, em especial à minha mãe Helena Olímpia e meu esposo Alexandre Roberto, pois sem eles nada disso teria sido possível!

Aos professores das disciplinas cursadas, pela atenção e compartilhamento dos conhecimentos importantíssimos nessa seara da 'Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio'. Sempre admirei o universo agropecuário e agora, mais do que nunca, é uma honra fazer parte dele!

Aos colegas da Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico, pelo coleguismo e ajuda no desenvolvimento dos trabalhos, em especial as técnicas Ana Paula e Milena Yasmin.

A todos que conheci durante a trajetória do doutorado, pois tive a oportunidade de conhecer pessoas de outros laboratórios, de outras instituições de ensino, de outros estados, de outros países e, com isso, adquirir novos conhecimentos e novas experiências para a minha carreira profissional. Tudo contribuiu para meu crescimento como pesquisadora científica na área de controle biológico e microbiologia com fungos entomopatogênicos em prol de um agronegócio mais inovador e sustentável.

Ao Instituto Biológico e ao Programa de Pós-graduação pela oportunidade de ter sido discente nesta Instituição de pesquisa qualificada e reconhecida nacionalmente e de importância significativa no desenvolvimento da sanidade, saúde e segurança alimentar na agricultura do país.

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

RESUMO GERAL

PEREIRA, Raquel Moraes Costa. **Prospecção de fungos endofíticos, edáficos e bioformulações para o controle de *Sphenophorus levis* VAURIE, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) na cultura da cana-de-açúcar** 2024. 174 f. Tese para defesa (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2024.

O objetivo geral deste trabalho foi prospectar fungos endofíticos e edáficos da cana-de-açúcar, desenvolver e testar um novo meio de cultura líquido para *Beauveria bassiana* (IBCB170) e *Metarhizium anisopliae* (IBCB383) e realizar testes para controle biológico de *Sphenophorus levis*. As amostras para a prospecção dos fungos foram coletadas em março e abril de 2022, com origem em três municípios do estado de São Paulo. Foram realizadas duas coletas em cada propriedade, totalizando seis coletas. Em cada coleta, foram selecionadas e retiradas 10 plantas e 10 amostras do solo ao redor de cada uma. Os fungos prospectados foram categorizados conforme a caracterização macroscópica e, após uma seleção prévia, seguiram para identificação molecular em nível de espécie. Para o desenvolvimento de um novo meio de cultura com as cepas IBCB170 e IBCB383, foram realizados dois processos de seleção: um em 2022, com testes de cinco meios, e outro em 2023, com testes de oito meios, utilizando variações nas fontes de carbono e nitrogênio. Em cada meio, foram feitas cinco repetições, inoculadas com 10 mL de suspensão fúngica na concentração de 1×10^8 blastosporos/mL, mantidas sob agitação a 160 rpm. Amostras de cada repetição foram coletadas em 72 horas e 168 horas, sendo avaliadas quanto à concentração de blastosporos/mL e unidades formadoras de colônia (UFC). O inóculo que apresentou maior concentração de blastosporos/mL foi utilizado para produção em biorreator de bancada. Para as bateladas com os meios da seleção SI-2022 e SII-2023, foram realizados experimentos com variações na quantidade de inóculo em relação ao volume do meio e no tempo de amostragem (72 horas e 168 horas). Nessas condições, foram avaliadas a concentração de blastosporos/mL e a contagem de UFC por plaqueamento. Em campo, o experimento foi realizado na Fazenda Boa Esperança, no município de Sertãozinho, São Paulo. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, utilizando blastosporos obtidos com os meios selecionados para IBCB170 e IBCB383 da seleção SI-2022, na concentração de 1×10^8 /mL, e suspensões contendo conídios aéreos de *B. bassiana* (IBCB66) e *M. anisopliae* (IBCB425), na concentração de 1×10^{13} /mL. Tanto para os experimentos de patogenicidade realizados com adultos de *S. levis* quanto para os experimentos no biorreator, foram aplicados ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$). Para os resultados do experimento de campo, foi utilizada ANOVA seguida do teste de Duncan ($p < 0,05$). Todos os testes foram realizados por meio do software RStudio®. Na

prospecção dos fungos endofíticos e edáficos, foi possível o isolamento de 576 fungos e a identificação molecular de 17 morfotipos. Nos experimentos de patogenicidade realizados com *S. levis*, o morfotipo USARC10C2 apresentou maior média de mortalidade (4,0); para os edáficos, o morfotipo ATSC2C1 teve maior média de mortalidade (5,0 na repetição 1 e 2,2 na repetição 2). Para as seleções dos novos meios de cultura, as maiores médias de blastosporos/mL foram: SI-2022 T2 para IBCB170 (5,65) e T4 para IBCB383 (16,15); e SII-2023 T2 para IBCB170 (2,57) e T4 para IBCB383 (1,298). Nos testes em biorreator de bancada, observou-se que a cepa IBCB170 produziu maior concentração de blastosporos/mL do que a cepa IBCB383. Quanto aos resultados de campo, a menor incidência de tocos atacados foi observada no tratamento com blastosporos de *M. anisopliae* IBCB383, com média de um toco atacado.

PALAVRAS-CHAVE: blastosporos. fermentação líquida submersa. biorreator. bateladas

GENERAL ABSTRACT

PEREIRA, Raquel Moraes Costa. **Prospection of endophytic and edaphic fungi and bioformulations for the control of *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) in sugarcane (*Saccharum officinarum*) cultivation**, 2024. 174 p. Thesis for defense (Doctorate in Health, Food Safety, and Environmental Security in Agribusiness) – Biological Institute, São Paulo Agency for Agribusiness Technology, Secretariat of Agriculture and Supply of the State of São Paulo, São Paulo, 2024.

Abstract

The main objective of this study was to prospect endophytic and edaphic fungi from sugarcane, develop and test a new liquid culture medium for *Beauveria bassiana* (IBCB170) and *Metarhizium anisopliae* (IBCB383), and conduct tests for the biological control of *Sphenophorus levis*. The samples for fungal prospecting were collected in March and April 2022 from three municipalities in the state of São Paulo, Brazil. Two collections were performed on each property, totaling six collections. In each collection, 10 plants and 10 soil samples from around each plant were selected and sampled. The prospected fungi were categorized based on macroscopic characterization and, after a preliminary selection, subjected to molecular identification at the species level. To develop a new culture medium for the IBCB170 and IBCB383 strains, two selection processes were conducted: one in 2022, testing five media, and another in 2023, testing eight media with variations in carbon and nitrogen sources. For each medium, five replicates were prepared, inoculated with 10 mL of fungal suspension at a concentration of 1×10^8 blastospores/mL, and maintained under agitation at 160 rpm. Samples from each replicate were collected at 72 and 168 hours and analyzed for blastospore concentration (blastospores/mL) and colony-forming units (CFU). The inoculum that presented the highest blastospore concentration (blastospores/mL) was used for production in a bench-scale bioreactor. For the batches using the media selected from the SI-2022 and SII-2023 trials, experiments were conducted with variations in inoculum volume relative to the medium volume and sampling times (72 hours and 168 hours). Under these conditions, blastospore concentration (blastospores/mL) and CFU counts through plating were evaluated. In the field, the experiment was conducted at Boa Esperança Farm, located in Sertãozinho, São Paulo. A randomized block design was used, employing blastospores obtained from the selected media for IBCB170 and IBCB383 from the SI-2022 trial at a concentration of 1×10^8 /mL, and suspensions containing aerial conidia of *B. bassiana* (IBCB66) and *M. anisopliae* (IBCB425) at a concentration of 1×10^{13} /mL. Both the pathogenicity experiments conducted with adult *S. levis* and the bioreactor experiments were analyzed using ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$). For the field experiment results, ANOVA followed by Duncan's test ($p < 0.05$) was applied. All statistical analyses were performed using RStudio®

software. In the prospecting of endophytic and edaphic fungi, 576 fungi were isolated, and 17 morphotypes were molecularly identified. In the pathogenicity experiments with **S. levis**, the morphotype USARC10C2 showed the highest mortality rate (4.0). Among the edaphic fungi, the morphotype ATSC2C1 exhibited the highest mortality rates (5.0 in the first trial and 2.2 in the second trial). For the new culture medium selections, the highest mean blastospore concentrations (blastospores/mL) were: SI-2022 T2 for IBCB170 (5.65) and T4 for IBCB383 (16.15); and SII-2023 T2 for IBCB170 (2.57) and T4 for IBCB383 (1.298). In bench-scale bioreactor tests, it was observed that the IBCB170 strain produced a higher blastospore concentration (blastospores/mL) than the IBCB383 strain. Regarding the field results, the lowest incidence of damaged stumps was observed in the treatment with *M. anisopliae* IBCB383 blastospores, with an average of one damaged stump.

Keywords: blastospores. submerged liquid fermentation. bioreactor. baches

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ilustração das duas formas de transmissão de fungos endofíticos. Imagem: Pereira, R.M.C., 2023).....	30
Figura 2.	Fases da fenologia da cana de açúcar. Adaptada de: Gasho e Shin, 1983.....	37
Figura 3.	Larva de <i>Sphenophorus levis</i> : a. na base da cana, b. dano no colmo. Imagem: Pereira, R.M.C., 2023.....	39
Figura 4.	Dimorfismo sexual em adultos de <i>Sphenophorus levis</i> . Imagem Pereira, R.M.C., 2024.....	40
Figura 5.	Fases do ciclo de vida de <i>Sphenophorus levis</i> : a. ovo; b. larva; c. pupa; d. adulto. Fonte: imagens a, b e c: Costa, V. A., Martins, L. F., 2018; imagem d. Pereira, R.M.C., 2023.....	40
Figura 6.	Impelidor para biorreator de bancada: a) turbina de Rushton; b) fluxo em relação ao vaso; C: movimento em relação as Chicanas. Imagem: a = Pereira, R.M.C., 2023, b e c adaptada de Alterthum et al., 2021.....	45
Figura 7.	Tipos de biorreatores: a: coluna de bolhas, b: airlift de cilindros concêntricos e c: airlift split-cylinder. Imagem adaptada de Mendes, 2016.....	46
Figura 8.	Biorreatores tipo Stirred Tank Reactor – STR com fermentação do meio T1.S.II-2023 de <i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB383. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.....	46
Figura 9.	Biorreatores em escalonamento: a) inóculos em Erlenmeyers, b) produção em biorreator de bancada, c) biorreator de escala piloto e d) biorreator de escala industrial. Imagem adaptada de: profissaobiotec.com.br, 2018.....	47
Figura 10.	Em destaque blastosporos do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB383 coletados de amostra de fermentação do biorreator 72h, em câmara de Neubauer na diluição 10^{-1} e sob microscópio óptico em 400x. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.....	52
Figura 11.	Processo infectivo após adesão do fungo entomopatogênico em hospedeiro. Imagem adaptada de Mascarin e Jaronski, 2016	53
Figura 12.	Croqui de georreferenciamento dos três municípios do Estado de São Paulo, nos quais foram realizadas as coletas das amostras da cana-de-açúcar e solo. Imagem adaptada do google imagens. Fonte: Pereira, R.M.C., 2023.....	71
Figura 13.	Fluxograma de desinfestação profunda para extração de fungo endofítico. Imagem: Pereira, R.M.C., 2022.....	72
Figura 14.	Fluxograma para geração dos códigos para a classificação macroscópica dos fungos expressos após os fragmentos ficarem em BOD $26^{\circ} C \pm 1$ e fotofase de 12 horas por quatro a cinco dias. Fonte: Pereira, R.M.C., 2023.....	73
Figura 15.	Etapas de preparação de amostras de solo para posterior diluição seriada. Imagens: Pereira, R.M.C., 2022.....	74
Figura 16.	Classificação macroscópica: a) placas com colônias das primeiras expressões; b) placa com expressão de fragmentos de folha; c) placas frente e verso com fungo da terceira repicagem da raiz. Imagens: Pereira, R.M.C., 2024.....	75
Figura 17.	Larvas de <i>Galleria mellonella</i> em processo de rastejamento em placas com fungos endofíticos. Imagens: Pereira, R.M.C., 2023.....	77

Figura 18.	Experimentos com <i>Sphenophorus levis</i> : a) Preparação e separação do material; b) verificação de sanidade e seleção dos insetos; c) separação das quantidades para cada experimento; d) material no fluxo laminar para aplicação das suspensões, em destaque o método de banho; e) colocação da dieta; f) avaliação da mortalidade e colocação em câmara úmida . Imagens: Pereira, R.M.C., 2024.....	78
Figura 19.	Colônias do morfotipo USAFC2C1 prospectado da folha, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	93
Figura 20.	Colônias do morfotipo USAFC3A2 prospectado da folha, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	94
Figura 21.	Colônias do morfotipo USAFC4C1 prospectado da folha, coleta II Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	94
Figura 22.	Colônias do morfotipo USAFC6A2 prospectado da folha, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	94
Figura 23.	Colônias do morfotipo USAFC6C prospectado da folha, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	94
Figura 24.	Colônias do morfotipo USAFC7B prospectado da folha, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	94
Figura 25.	Colônias do morfotipo USAFC8C prospectado da folha, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	95
Figura 26.	Colônias do morfotipo USARC1C2 prospectado da raíz, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	95
Figura 27.	Colônia do morfotipo USARC4C2 prospectado da raíz, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	95
Figura 28.	Colônias do morfotipo USARC4B2 prospectado da raíz, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	95
Figura 29.	Colônias do morfotipo USARC9C1 prospectado da raíz, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	96
Figura 30.	Colônias do morfotipo USARC10C1 prospectado da raíz, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	96
Figura 31.	Colônias do morfotipo USJFC1C prospectado da folha, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	96
Figura 32.	Colônias do morfotipo USJFC2C1 prospectado da folha, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	96
Figura 33.	Colônias do morfotipo USJFC2C2 prospectado da folha, à coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	97
Figura 34.	Colônias do morfotipo USJFC4A1 prospectado da folha, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	97
Figura 35.	Colônias do morfotipo USJFC5B2 prospectado da folha, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	97
Figura 36.	Colônias do morfotipo USJFC6B1 prospectado da folha, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	97

Figura 37.	Colônias do morfotipo USJFC9A1 prospectado da folha, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	98
Figura 38.	Colônias do morfotipo USJRC2B1 prospectado da raíz, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	98
Figura 39.	Colônias do morfotipo USJRC5C prospectado da raíz, coleta II, Usina São João: frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	98
Figura 40.	Colônias do morfotipo USJRC10C3 prospectado da raíz, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	98
Figura 41.	Colônias do morfotipo ATFC5C1 prospectados da folha, coleta II, Usina Agroterenas: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	99
Figura 42.	Colônias do morfotipo ATFC8C2 prospectado da folha, à coleta II, Usina Agroterenas: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	99
Figura 43.	Colônias do morfotipo ATFC9B2 prospectado da folha, coleta II, Usina Agroterenas: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	99
Figura 44.	Colônias do morfotipo ATRC1C2 prospectado da raíz, coleta II, Usina Agroterenas: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	99
Figura 45.	Colônias do morfotipo ATRC4C1 prospectado da raíz, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	100
Figura 46.	Colônias do morfotipo ATRC5A prospectado da raíz, coleta II, Usina Agroterenas: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	100
Figura 47.	Colônias do morfotipo ATRC5C1 prospectado da raíz, coleta II, Usina Agroterenas: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	100
Figura 48.	Colônias do morfotipo ATRC6A1 prospectado da raíz, à coleta II, Usina Agroterenas: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.....	100
Figura 49.	Fungo endofítico <i>Beauveria bassiana</i> prospectado da folha, morfotipo 7 da amostra USAFC2A1, coleta I, Usina Santo Antônio. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.....	102
Figura 50.	Fungo endofítico <i>Penicillium chrysogenum</i> group prospectado da folha, morfotipo 11 da amostra USAFC2C1, coleta I, Usina Santo Antônio. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.....	103
Figura 51.	Fungo endofítico <i>Fusarium andiyazi</i> prospectado da folha, morfotipo 26 da amostra USAFC6B2, coleta I, Usina Santo Antônio. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.....	103
Figura 52.	Fungo endofítico <i>Fusarium oxysporum</i> prospectado da raíz, morfotipo 26 da amostra USARC7A1, coleta I, Usina Santo Antônio. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.....	103
Figura 53.	Fungo endofítico <i>Fusarium oxysporum</i> prospectado da raíz, morfotipo 40 da amostra USARC10C2, coleta I, Usina Santo Antônio. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.....	103
Figura 54.	Fungo endofítico <i>Beauveria bassiana</i> prospectado da folha, morfotipo 20 da amostra USJFC6B1, coleta I, Usina São João. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.....	104
Figura 55.	Fungo endofítico <i>Beauveria bassiana</i> prospectado da folha, morfotipo 29 da amostra USJFC9C1, coleta I, Usina São João. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.....	104

Figura 56.	Fungo endofítico <i>Fusarium oxysporum</i> prospectado da folha, morfotipo 10 da amostra USAFC3A2, coleta II, Usina Santo Antônio. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.....	104
Figura 57.	Fungo endofítico <i>Trichosporon asahii</i> prospectado da folha, morfotipo 21 da amostra ATFC5A2, coleta II, Usina Agroterenas. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.....	105
Figura 58.	Fungo endofítico <i>Fusarium oxysporum</i> prospectado da raíz, morfotipo 5 da amostra ATRC1C2, coleta II, Usina Agroterenas. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.....	105
Figura 59.	Fungo endofítico <i>Aspergillus sojae</i> prospectado da raíz, morfotipo 19 referente da amostra ATRC4C2, coleta II, Usina Agroterenas. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.....	105
Figura 60.	Fungo edáfico <i>Fusarium oxysporum</i> prospectado do solo, morfotipo 4 da amostra USASC3A, coleta II, Usina Santo Antônio Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.....	105
Figura 61.	Fungo edáfico <i>Purpureocillium lilacinum</i> prospectado do solo, morfotipo 9 da amostra USASC5B1, coleta II, Usina Santo Antônio. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.....	106
Figura 62.	Fungo edáfico <i>Fusarium oxysporum</i> prospectado do solo, morfotipo 5 da amostra USJSC2C2, coleta II, Usina São João. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024	106
Figura 63.	Fungo edáfico <i>Aspergillus sojae</i> prospectado do solo, morfotipo 1 da amostra ATSC2C1, coleta II, Usina Agroterenas. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.....	106
Figura 64.	Fungo edáfico <i>Fusarium fujikuroi</i> prospectado do solo, morfotipo 4 da amostra ATSC3C2, coleta II, Usina Agroterenas. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.....	106
Figura 65.	Porcentagem de mortalidade confirmada em teste de patogenicidade de fungos endofíticos de cana-de-açúcar em <i>Galleria mellonella</i> . Fonte: Pereira, R.M.C., 2023.....	107
Figura 66.	Parte do experimento com larvas de <i>Galleria mellonella</i> x fungos endofíticos coleta I: a) placa da repicagem com colônias do fungo; b) placa com colônias (repicagem 2) para o experimento; c) larvas de <i>G. mellonella</i> esporulada; d) placa com colônias do fungo endofítico repicado da larva esporulada. Imagem: Pereira, R.M.C., 2023.....	107
Figura 67.	Médias de mortalidade total de <i>Sphenophorus levis</i> após aplicação de suspensão fúngica com diferentes tratamentos do fungo endofítico USJFC6B1 <i>Beauveria bassiana</i> . Resultados após o teste Tukey ($p < 0,05$) por meio do software RStudio. Fonte, Pereira, R.M.C., 2024.....	108
Figura 68.	Médias de mortalidade total de <i>Sphenophorus levis</i> após aplicação de suspensão fúngica com diferentes tratamentos do fungo endofítico ATFC5A2 <i>Trichosporon asahii</i> . Resultados após o teste Tukey ($p < 0,05$) por meio do software RStudio. Fonte, Pereira, R.M.C., 2024.....	108
Figura 69.	Médias de mortalidade total de <i>Sphenophorus levis</i> após aplicação de suspensão fúngica com diferentes tratamentos do fungo endofítico USARC10C2 <i>Fusarium oxysporum</i> . Resultados após o teste Tukey ($p < 0,05$) por meio do software RStudio. Fonte, Pereira, R.M.C., 2024.....	109
Figura 70.	Médias de mortalidade total de <i>Sphenophorus levis</i> após aplicação de suspensão fúngica com diferentes tratamentos do fungo endofítico USASC8A1 <i>Penicillium chrysogenum</i> group. Resultados após o teste Tukey ($p < 0,05$) por meio do software RStudio. Fonte, Pereira, R.M.C., 2024.....	109

Figura 71.	Médias de mortalidade total de <i>Sphenophorus levis</i> após aplicação de suspensão fúngica com diferentes tratamentos do fungo endofítico ATSC2C1 <i>Aspergillus sojae</i> . Resultados após o teste Tukey ($p < 0,05$) por meio do software RStudio. Fonte, Pereira, RMC, 2024....	110
Figura 72.	Etapas de confirmação de mortalidade de <i>Sphenophorus levis</i> após aplicação do fungo edáfico ATSC2C1 <i>Aspergillus sojae</i> : a) placa da avaliação da mortalidade com insetos esporulados após 7 dias em câmara úmida; b) <i>Sphenophorus levis</i> infectado e esporulado; c) Placa de Petri com colônias do fungo repicado da carcaça do inseto; d) lâmina com conidióforo e conídios do fungo edáfico sob microscópio óptico em 400x. Imagem: Pereira, RMCP, 2024.....	110
Figura 73.	Médias de mortalidade total de <i>Sphenophorus levis</i> após aplicação de suspensão fúngica com diferentes tratamentos do fungo endofítico ATSC2C1 <i>Aspergillus sojae</i> . Resultados após o teste Tukey ($p < 0,05$) por meio do software RStudio. Fonte, Pereira, RMC, 2024.....	111
Figura 74.	Colônias de <i>Beauveria bassiana</i> IBCB170. Imagem: Pereira, R.M.C., 2023.....	128
Figura 75.	Colônias de <i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB383. Imagem: Pereira, R.M.C., 2023.....	128
Figura 76.	Parte do processo da seleção S.I-2022: a) pesagem dos componentes, b) Erlenmeyers com meio para cepa IBCB170 para autoclavagem. Imagem: Pereira, R.M.C., 2022.....	131
Figura 77.	Inóculos para a seleção S.I-2022 com IBCB383 em processo de fermentação em mesa orbital. Imagem: Pereira, R.M.C., 2023.....	132
Figura 78.	Inóculos de IBCB170 para a seleção S.II-2023 em processo de fermentação em mesa orbital fechada e controle de temperatura. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.....	132
Figura 79.	Biorreator de bancada em processo de fermentação: a) chiller; b) torre de comando; c) vaso com as sondas; QRcode para acesso ao vídeo no Youtube. Imagem e QRcode: Pereira, R.M.C., 2023.....	133
Figura 80.	Registros realizados durante o preparo das bateladas; a) medição e estabilização do pH; b) equipamento vedado e pinçado; c) equipamento para colocação na autoclave. Imagens: Pereira, R.M.C., 2023.....	135
Figura 81.	Registros realizados durante as avaliações de amostras do biorreator; a) em destaque, blastosporos de <i>Beauveria bassiana</i> IBCB170 S.I-2022 em 72h; b) em destaque blastosporos de <i>Metharhizium anisopliae</i> IBCB383 S.I-2022 em 168h. Imagens: Pereira, R.M.C., 2023.....	135
Figura 82.	Média de concentração de blastosporos de IBCB170 com o inóculo T2 da seleção S.I-2022 em relação ao tempo e ao volume após aplicação do teste Tukey ($p > 0,05$).....	139
Figura 83.	Média de concentração de blastosporos de IBCB383 com o inóculo T4 da seleção S.I-2022 em relação ao tempo e ao volume após aplicação do teste Tukey ($p > 0,05$).....	140
Figura 84.	Média de concentração de blastosporos de IBCB170 com o inóculo T2 da seleção S.II-2023 em relação ao volume após aplicação do teste Tukey ($p > 0,05$).....	141
Figura 85.	Média de concentração de blastosporos de IBCB383 com o inóculo T1 da seleção S.II-2023 em relação ao volume após aplicação do teste Tukey ($p > 0,05$).....	142
Figura 86.	Verificação de sanidade de <i>Sphenophorus levis</i> e separação para uso em experimento. Imagem: Pereira, R.M.C., 2023.....	161

Figura 87.	Preparação dos inóculos com novos meios de cultura seleção S.I-2022; a) diluição; b) inóculos IBCB170 S.I-2022; c) inóculos IBCB383 S.I-2022. Imagens: Pereira, R.M.C., 2023.....	162
Figura 88.	Montagem de experimento com <i>S. levis</i> . No detalhe, método de aplicação por banho. Imagens: Pereira, RMC, 2024.....	162
Figura 89.	Croqui da área de instalação do experimento de campo. Fonte: Almeida, J.E.M., 2023.....	163
Figura 90.	Preparação de blastosporos em meio líquido para aplicação em campo; a) galões de vidro em fermentação por coluna de bolhas, com blastosporos de IBCB170 e IBCB383; b) Inóculos de T4.S.II-2022-IBCB383 em avaliações para cálculo de concentração e viabilidade. Imagens: Pereira, R.M.C., 2023.....	164
Figura 91.	Média de mortalidade de adultos de <i>Sphenophorus levis</i> com blastosporos do inóculo T2 da seleção S.I-2022, após aplicação do teste Tukey ($p > 0,05$).....	165
Figura 92.	Média de mortalidade de adultos de <i>Sphenophorus levis</i> com blastosporos do inóculo T4 da seleção S.I-2022, após aplicação do teste Tukey ($p > 0,05$).....	166
Figura 93.	Média de mortalidade de adultos de <i>Sphenophorus levis</i> com blastosporos do inóculo T2 da seleção S.II-2023, após aplicação do teste Tukey ($p > 0,05$).....	166
Figura 94.	Média de mortalidade de adultos de <i>Sphenophorus levis</i> com blastosporos do inóculo T1 da seleção S.II-2023, após aplicação do teste Tukey ($p > 0,05$).....	167
Figura 95.	Médias de tocos atacados por adultos de <i>S. levis</i> após aplicação do teste Duncan ($p < 0,05$). 168	168

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de folhas, coleta I, Usina Santo Antônio – USA.....	79
Tabela 2.	Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de raízes, coleta I, Usina Santo Antônio – USA	80
Tabela 3.	Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de folhas, coleta II, Usina Santo Antônio – USA	81
Tabela 4	Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de raízes, coleta II, Usina Santo Antônio – USA.....	82
Tabela 5.	Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de folhas, coleta I, Usina São João – USJ.....	83
Tabela 6.	Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de raízes, coleta I, Usina São João – USJ	84
Tabela 7.	Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de folhas, coleta II , Usina São João – USJ.....	85
Tabela 8.	Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de raízes, coleta II, Usina São João – USJ	86
Tabela 9.	Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de folhas, coleta I , Agroterenas – AT	87
Tabela 10.	Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de raízes, coleta I, Agroterenas – AT	88
Tabela 11.	Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de folhas, coleta II , Agroterenas – AT	89
Tabela 12.	Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de raízes, coleta II , Agroterenas – AT	90
Tabela 13.	Classificação macroscópica dos fungos edáficos isolados de amostras de solo, Usina Santo Antônio – USA, coleta I	91
Tabela 14.	Classificação macroscópica dos fungos edáficos isolados de amostras de solo, Usina Santo Antônio – USA, coleta II.....	92
Tabela 15.	Classificação macroscópica dos fungos edáficos isolados de amostras de solo, Usina São João – USJ, coleta I	92
Tabela 16.	Classificação macroscópica dos fungos edáficos isolados de amostras de solo, Usina São João – USJ, coleta II	92
Tabela 17.	Classificação macroscópica dos fungos edáficos isolados de amostras de solo, Usina Agroterenas – AT, coleta I	93
Tabela 18.	Classificação macroscópica dos fungos edáficos isolados de amostras de solo, Usina Agroterenas - AT, coleta II	93

Tabela 19.	Fungos endofíticos e edáficos da cana-de-açúcar, referentes às coletas I e II, folhas, raízes e solo, enviados para avaliação molecular	101
Tabela 20.	Espécies identificadas após análise molecular dos fungos endofíticos e edáficos da cana-de-açúcar, referentes às coletas I e II, folhas, raízes e solo	102
Tabela 21.	Média de mortalidade de <i>Sphenophorus levis</i> infectados com suspensão fúngica de conídios aéreos de fungos endofíticos aplicados por imersão em condições de laboratório	116
Tabela 22.	Média de mortalidade de <i>Sphenophorus levis</i> infectados com suspensão fúngica de conídios aéreos de fungos edáficos aplicados por banho em condições de laboratório	117
Tabela 23.	Componentes básicos para desenvolvimento de meio de cultura para fermentação líquida de IBCB170 e IBCB383, quantidades proporcionais ao balanceamento em g/L	129
Tabela 24.	Variação da fonte de Nitrogênio e complexo vitamínico nos de tratamentos S.I-2022**	130
Tabela 25.	Variação nas fontes de carbono e nitrogênio para os tratamentos de *S.II-2023 ..	130
Tabela 26.	Delineamento de bateladas com resultado da seleção de meio de cultura S.I-2022*	134
Tabela 27.	Delineamento de bateladas com o melhor resultado do meio de cultura com base no S.II-2023*	134
Tabela 28.	Médias de concentração de blastosporos/mL e modulação natural do pH de amostras com 72h para os tratamentos testados na seleção S.I-2022* para a cepa IBCB170	137
Tabela 29.	Médias de concentração de blastosporos/mL e modulação natural do pH de amostras com 72h para os tratamentos testados na seleção S.I-2022* para a cepa IBCB383	137
Tabela 30.	Médias de concentração de blastosporos/mL e modulação natural do pH de amostras com 72h para os tratamentos testados na seleção S.II-2023* para a cepa IBCB170	138
Tabela 31.	Médias de concentração de blastosporos/mL e modulação natural do pH de amostras com 72h para os tratamentos testados na seleção S.II-2023* para a cepa IBCB383	138
Tabela 32.	Médias de UFC para inóculo *T2.S.I-2022 de IBCB170, em relação ao tempo e ao volume	139
Tabela 33.	Médias de UFC para inóculo *T4.S.I-2022 de IBCB383, em relação ao tempo e ao volume	140
Tabela 34.	Médias de UFC para inóculo *T2.S.II-2023 de IBCB170, em relação ao tempo e ao volume	141

Tabela 35.	Médias de UFC para inóculo *T2.S.II-2023 de IBCB383, em relação ao tempo e ao volume	142
Tabela 36.	Representação dos tratamentos aplicados em campo para inseticida microbiológico com princípio ativo blastosporos de IBCB170 e IBCB383 e suspensões de conídios aéreos IBCB66 e IBCB425	163
Tabela 37.	Média de mortalidade de adultos de <i>Sphenophorus levis</i> após a aplicação de suspensão com blastosporos	167

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	ix
GENERAL ABSTRACT.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xvii
SUMÁRIO	xx
1. INTRODUÇÃO GERAL	26
2. OBJETIVO.....	29
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
3.1 Fungos endofíticos	30
3.2 Fungos edáficos.....	32
3.3 Análise macroscópica.....	33
3.4 Análise molecular	34
3.5 A cultura da cana-de-açúcar	35
3.5.1 Pragas da cana-de-açúcar	38
3.5.2 <i>Sphenophorus levis</i> , Vaurie 1978 (Coleoptera: Curculionidae)	39
3.6 Fermentação líquida submersa - FLS.....	41
3.7 Desenvolvimento de meio de cultura líquido.....	42
3.8 Biorreatores de bancada	44
3.9 Bioinseticidas no controle biológico	48
3.10 Fungos entomopatogênicos.....	50
3.11 Uso de blastosporos como bioinseticida	52
3.12 Controle de pragas com bioinseticidas	54
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

CAPÍTULO I PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS E EDÁFICOS DA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR, E PATOGENICIDADE EM ADULTOS DE *Sphenophorus levis* EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

RESUMO.....	67
ABSTRACT	68
5. INTRODUÇÃO	69
6. OBJETIVO	70

7.	MATERIAL E MÉTODOS.....	71
7.1	Localização das coletas.....	71
7.2	Prospecção de fungos endofíticos	72
7.3	Prospecção de fungos edáficos	73
7.4	Análise macroscópica	75
7.5	Análise molecular e identificação de espécies	75
7.6	Experimentos	76
7.6.1	Experimento com inseto-teste <i>Galleria mellonella</i>	76
7.6.2	Experimentos com adultos de <i>Sphenophorus levis</i>	77
7.7	Análise estatística	78
8.	RESULTADOS.....	78
8.1	Prospecção de fungos endofíticos	78
8.2	Prospecção de fungos edáficos	91
8.3	Morfotipos	93
8.4	Avaliação molecular e espécies identificadas	101
8.5	Experimentos de patogenicidade em condições de laboratório	107
8.5.1	Experimento com inseto-teste <i>G. mellonella</i>	107
8.5.2	Experimentos com adultos de <i>S. levis</i> e fungos endofíticos	108
8.5.3	Experimentos com adultos de <i>S. levis</i> e fungos edáficos	109
9.	DISCUSSÃO	111
9.1	Prospecção de fungos endofíticos	111
9.2	Prospecção de fungos edáficos	113
9.3	Espécies identificadas	114
9.4	Experimentos de patogenicidade em condições de laboratório	115
9.4.1	Experimento com inseto-teste <i>G. mellonella</i>	115
9.4.2	Experimentos com adultos de <i>S. levis</i> x fungos endofíticos	116
9.4.3	Experimentos com adultos de <i>S. levis</i> x fungos edáficos	117
10.	CONCLUSÕES	118
11.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

CAPÍTULO II
SELEÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA FERMENTAÇÃO
LÍQUIDA SUBMERSA DE BLASTOSPOROS DE *Beauveria bassiana*
IBCB170 e *Metharhizium anisopliae* IBCB383

	RESUMO.....	123
	ABSTRACT	124
12	INTRODUÇÃO.....	125

13.	OBJETIVO	127
14.	MATERIAL E MÉTODOS.....	127
14.1	Seleção e origem das cepas	127
14.2	Balanceamento dos componentes	128
14.3	Seleção nutricional para meio de cultura para IBCB170 e IBCB 383 em Erlenmeyers....	129
14.4	Experimentos com inóculos da S.I-2022 e S.II-2023 para IBCB170 e IBCB383 em bioreator de bancada	133
14.5	Análise estatística.....	136
15.	RESULTADOS	137
15.1	Seleção nutricional para meio de cultura para IBCB170 e IBCB383 em Erlenmeyers	137
15.2	Experimentos com inóculos da S.I-2022 e S.II-2023 para IBCB170 e IBCB383 em bioreator de bancada	139
16.	DISCUSSÃO.....	143
16.1	Seleção nutricional para meio de cultura para IBCB170 e IBCB 383 em Erlenmeyers....	143
16.2	Experimentos com inóculos da S.I-2022 e S.II-2023 para IBCB170 e IBCB383 em bioreator de bancada	148
17.	CONCLUSÕES.....	153
18.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154

CAPÍTULO III

PATOGENICIDADE DOS FUNGOS PRODUZIDOS EM FERMENTAÇÃO LÍQUIDA SUBMERSA EM ADULTOS *Sphenophorus levis* EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E CAMPO DE CANA-DE-AÇÚCAR

	RESUMO.....	157
	ABSTRACT.....	158
19.	INTRODUÇÃO.....	159
20.	OBJETIVO	161
21.	MATERIAL E MÉTODOS.....	161
21.1	Experimentos com adultos de <i>Sphenophorus levis</i> em laboratório	161
21.2	Experimentos em campo	163
21.3	Análise estatística	165
22.	RESULTADOS	165
22.1	Experimentos com adultos de <i>Sphenophorus levis</i> em laboratório	165
22.2	Experimentos em campo	167
23.	DISCUSSÃO.....	168
23.1	Experimentos com adultos de <i>Sphenophorus levis</i> em laboratório	168

23.2	Experimentos em campo	170
24.	CONCLUSÕES	171
25.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	172

1. INTRODUÇÃO GERAL

São considerados fungos endofíticos os microrganismos que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar danos visíveis aos hospedeiros (Barros et al., 2023). Devido ao potencial dos metabólitos produzidos por microrganismos tais como bactérias, leveduras e fungos, o interesse no conhecimento do comportamento desses microrganismos tem sido crescente em diferentes áreas, tais como a alimentícia, a farmacologia e a agrícola (Bernardi-Wenzel et al., 2012; Rho et al., 2018; Embrapa Meio Ambiente, 2021; Bogas et al., 2024).

No setor agrícola, um exemplo de fungo endofítico bastante conhecido por sua capacidade de beneficiar as plantas, tais como a promoção do crescimento e até mesmo repelência a algumas pragas, é o *Trichoderma* sp. Por meio dos seus mecanismos de ação e produção de metabólitos secundários, pode controlar outros organismos de forma eficiente, por meio de competição, parasitismo e produção de toxinas como enzimas líticas (proteases, lipases, glucanase e quitinase) que facilitam a degradação das cutículas de outros microrganismos, principalmente no solo (Bettiol et al., 2019; Gabardo, 2020; Luciano et al., 2023).

Em relação aos conídios aéreos e blastoconídios ou blastosporos, pesquisas para inovações no desenvolvimento de novos bioinseticidas e melhoria nas condições de fermentação e uso de microrganismos em campo já existem. São estudos que tratam de aspectos genéticos, da melhoria de resistência aos raios UV, questões sobre viabilidade, melhoria nas condições do tempo de prateleira e aplicação em condições de campo (Ottatti-de-Lima et al., 2010). Por exemplo, estudos de Peng et al. (2021) tratam da questão da fotorreativação, na qual mostram que a interação das proteínas do colarinho branco com as fotoliasas é essencial para reparar danos ao DNA induzidos por UV, melhorando significativamente a viabilidade dos conídios após a exposição aos UV. É fato que os processos fermentativos utilizados para a obtenção de conídios aéreos ainda são feitos usando como substrato o arroz parboilizado, e que, para as células blastospóricas por meio de fermentação líquida, ainda são necessárias mais pesquisas para melhorar suas condições para produção em escala industrial (Michereff-Filho et al., 2009; Mascarin; Jaronski, 2016; Almeida, 2020). No entanto, a fermentação líquida submersa de fungos entomopatogênicos tem sido alvo de pesquisas visando novas formulações com potencial para a produção de bioinseticidas em larga escala (Mascarin et al., 2018; Basso, 2023).

Para um bom resultado no uso das técnicas para fermentação líquida submersa, quer em Erlenmeyers ou biorreatores (de bancada, piloto ou industrial), é necessário conhecer

o microrganismo de interesse para melhor ajustar os componentes do meio, tais como fontes de carbono e nitrogênio e elementos traços como os sais, além de parâmetros como pH, agitação, aeração e pO₂. Além disso, para a obtenção de seus metabólitos de interesse, boa concentração e capacidade de virulência, é necessário utilizar meio de cultura específico para o microrganismo selecionado, visto que as necessidades de nutrientes e o balanceamento mais adequado vão depender da espécie utilizada (Batista-Filho et al., 1985; Mascarin et al., 2014; Mascarin et al., 2019; Alterthum et al., 2021; Schmidell; Zaffonato, 2021).

Apesar de existirem pesquisas para melhoria das células blastospóricas em relação à resistência às adversidades em campo, ainda são necessários mais estudos que possam ir além, pois aspectos referentes a armazenamento, transporte e viabilidade da estrutura infectiva são fatores que limitam o aumento da adesão aos bioprodutos (Ottati-de-Lima, 2010; Almeida, 2020). Pesquisas com o uso de fermentação líquida submersa têm tido aumento no que se refere à busca de inovações no desenvolvimento de novos meios de cultura para os fungos entomopatogênicos (Alterthum et al., 2021).

O uso de biorreatores de bancada no desenvolvimento de novos meios de cultura tem ganhado destaque em pesquisas que buscam inovação e aprimoramento na produção de microrganismos. Frequentemente, são estudadas bactérias como *Escherichia coli*, amplamente utilizada em engenharia genética e na produção de proteínas recombinantes devido à facilidade de manipulação genética; *Lactobacillus* spp., essencial na produção de ácido láctico, que encontra ampla aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de bioplásticos, além de ser fundamental em fermentações lácteas e na formulação de produtos probióticos; e *Bacillus subtilis* e *Bacillus thuringiensis*, amplamente empregados na agricultura para o controle biológico de pragas e doenças, contribuindo para a redução do uso de pesticidas químicos e promovendo uma agricultura mais sustentável. Essas bactérias também desempenham papel importante na produção de enzimas industriais, como amilases, proteases e lipases (Alterthum et al., 2021; Schmidell; Zaffonato, 2021). Estudos envolvendo fungos filamentosos em fermentação líquida têm apresentado um crescimento expressivo nos últimos anos, impulsionados pela necessidade de soluções sustentáveis em áreas como agricultura, indústria alimentícia, farmacêutica e de biocombustíveis. Fungos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* têm sido amplamente explorados na produção de biopesticidas, devido à sua eficiência no controle de pragas agrícolas e sua compatibilidade com práticas de manejo integrado (Mascarin; Jaronski, 2016).

A utilização de biorreatores, além de diminuir as chances de contaminações, permite maior rapidez na produção das células de interesse, uma vez que permite o controle de parâmetros como pH, temperatura e oxigenação para determinação das condições ideais para o tipo de célula ou metabólitos que se deseja do microrganismo de interesse. Assim, a realização de pesquisas colabora para a produção em nível industrial de bioprodutos de alta qualidade, garantindo a eficácia do produto. Ainda, vale ressaltar que a adoção de bioinseticidas por fermentação líquida vai além da contribuição para o enfrentamento das adversidades climáticas no controle de pragas e doenças, pois migrar da fermentação sólida para a líquida é interessante também do ponto de vista da segurança alimentar, visto que o arroz é um item de valor para a alimentação humana (Mascarin et al., 2015; Mascarin et al., 2019; Almeida, 2020; Schmidell; Zanfonato, 2021).

Em geral, o uso dos biodefensivos tem sido adotado como parte do manejo integrado de pragas em diferentes culturas, tais como a da soja, a do milho, a do algodão e da cana-de-açúcar. Além disso, tem sido considerado uma estratégia promissora para redução do uso de pesticidas químicos e na mitigação dos impactos ambientais associados à agricultura convencional (Almeida, 2020; Tonso et al., 2021).

O Brasil é o maior produtor mundial de açúcar, e a maior produção de cana-de-açúcar está no Estado de São Paulo, com 60% da produção e crescimento de 23,0% em relação ao ciclo anterior (Conab, 2024; Unica, 2024). Entretanto, apesar da maior produtividade, as lavouras paulistas, assim como as grandes monoculturas, sofrem com danos significativos relacionados ao controle de pragas, incluindo o *Sphenophorus levis* (Vaurie). Os adultos ocorrem em duas épocas do ano, entre fevereiro e março e entre outubro e novembro (Precetti; Teran, 1983; Izeppi, 2015). Apesar da baixa motilidade em campo, esta praga pode causar prejuízos na ordem de até 30 toneladas por hectare e por ano (Bortoloti; Sampaio, 2022). É um inseto de hábito críptico, pois em sua fase larval adentra ao colmo da planta em busca de alimento, causando danos significativos (Degaspari et al., 1987; Giometti et al., 2011).

Nas usinas produtoras de cana-de-açúcar, o controle de *S. levis* tem sido realizado comumente pela instalação de iscas compostas por toletes de cana com diferentes atrativos e pela aplicação direta (com o cortador de soqueiras) de caldo composto por nutrientes e, ao mesmo tempo, bioprodutos à base de bactérias (Evangelista et al., 2017).

Além do controle de pragas e doenças, da promoção de crescimento, outro aspecto importante e vantajoso quando se compara o uso dos biológicos com os produtos de

origem química é que os biológicos contribuem também para a saúde do solo, ajudando a manter a diversidade no microbioma e alinhando-se às demandas crescentes pela sustentabilidade na agricultura (Silva et al., 2012; Pereira et al., 2021).

Este trabalho teve por objetivo contribuir com o desenvolvimento de pesquisas no setor dos bioprodutos, com foco nos bioinseticidas por fermentação líquida e contribuir com as inovações na produção de meios de cultura compatíveis para fungos entomopatogênicos. Por esta razão, os investimentos contínuos em pesquisa e desenvolvimento são essenciais para aprimorar a eficácia e a competitividade dos bioinsumos, impulsionando a transição de práticas agrícolas convencionais para as mais sustentáveis e resilientes (Almeida; Costa, 2023).

2. Objetivo

2.1 Objetivo Geral

Prospectar fungos endofíticos e edáficos da cana-de-açúcar, desenvolver e testar novo meio de cultura para fermentação de blastosporos de *Beauveria bassiana* IBCB170 e *Metarhizium anisopliae* IBCB383, e realizar testes para controle biológico de *Sphenophorus levis*.

2.1.1 Objetivos específicos

1 – Isolar fungos endofíticos e edáficos de cultivares comerciais de cana-de-açúcar em três regiões produtoras do Estado de São Paulo;

2 – Selecionar isolados de fungos endofíticos e testar o potencial entomopatogênico em adultos de *S. levis*, por aplicação de suspensões por imersão, em diferentes concentrações em laboratório;

3 – Desenvolver novo meio de cultura para fermentação líquida submersa com blastosporos de *B. bassiana* IBCB170 e *M. anisopliae* IBCB383;

4 – Avaliar a eficiência dos novos meios de cultura com blastosporos de IBCB170 e IBCB383 em adultos de *S. levis* em laboratório e em campo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fungos endofíticos

Fungos endofíticos, assim como os fitopatógenos, podem se disseminar sistemicamente pelo hospedeiro, tendo como porta de entrada estômatos, hidatódios e outras aberturas naturais ou injúrias de origem mecânica ou química, e ocupam nichos semelhantes no interior da planta. Além disso, a transmissão dos fungos para as plantas pode se dar de duas maneiras (Figura 01): de forma horizontal, quando os esporos atingem a parte aérea da planta, e de forma vertical, quando o fungo é oriundo de sementes ou das relações com as raízes e solo (Saikkonen et al., 2004; Vieira et al., 2011; Alves et al., 2011; Chapla; Biasetto; Araújo, 2012; Anyasi; Atagana, 2019).

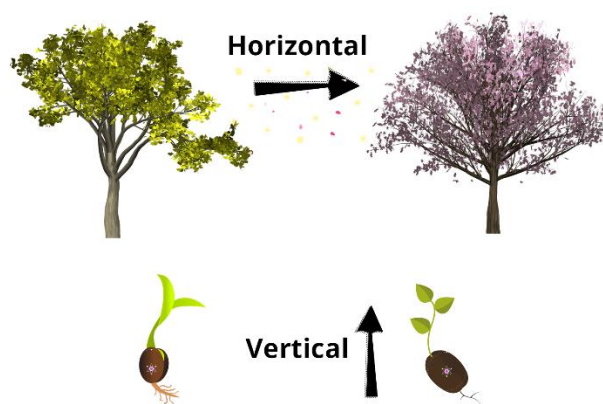


Figura 01. Ilustração das duas formas de transmissão de fungos endofíticos. Imagem: Pereira, R.M.C., 2023).

Os fungos endofíticos são estudados em biomas e culturas diferentes. São diversificados e sua interação com a planta pode estimular mudanças no metabolismo, podendo auxiliar na melhoria das defesas do hospedeiro. Estão presentes em quase todas as plantas vasculares, algas marinhas, musgos e samambaias estudadas até o momento (Arnold et al., 2009; Chapla; Biasetto; Araújo, 2012).

Esses fungos possuem uma interessante capacidade em sua plasticidade fenotípica. Esta é uma estratégia importante para seus mecanismos de adaptação em ambientes diferentes, como, por exemplo, após procedimentos de prospecção, nos quais a expressão morfológica em relação à cor, textura, topografia e padrão de crescimento pode sofrer alterações devido às condições artificiais de cultivo, que diferem das condições encontradas no interior da planta (Manganyi et al., 2018).

Considerando a capacidade de plasticidade fenotípica dos fungos, alguns podem modificar a expressão de genes envolvidos na produção de enzimas que degradam a cutícula do inseto hospedeiro, o que lhes permite infectar diferentes espécies de insetos com diferentes tipos de cutícula (Boucias, 1988; Butt et al., 2006). A compreensão desses processos adaptativos pode ajudar no desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle biológico de insetos.

Todavia, estudos com microrganismos endofíticos para produção de metabólitos secundários utilizados na agricultura ainda são maioria para as bactérias. Estudos com fungos e a detecção de cepas com potencial entomopatogênico ainda são poucos, mas necessários para o incremento na produção de bioinseticidas, sejam sólidos ou líquidos, e, não menos importante, para a diminuição da utilização de agroquímicos (Bernardi-Wenzel et al., 2012; Almeida, 2020; Schmidell; Zanfonato, 2021).

Alguns fungos endofíticos também são capazes de promover o crescimento das plantas, por meio da produção de hormônios de crescimento ou nutrientes essenciais, e outros permitem a capacidade de repelência de alguns insetos. Compostos produzidos por esses fungos podem ser de grande interesse para a indústria, pois apresentam atividade biológica, com propriedades antimicrobianas, antitumorais, anti-inflamatórias e, entre outras, o potencial de patogenicidade a pragas alvo do controle biológico, como o caso do fungo *Beauveria bassiana*, que tem como principal reservatório o solo, mas também é encontrado de maneira endofítica (Azevedo, 1998; Zhang et al., 2006; Cuzzi et al., 2011; Bernardi-Wenzel et al., 2012; Azevedo; Barata, 2018; Rho et al., 2018; Bogas et al., 2024).

A prospecção de fungos endofíticos é, em geral, realizada por meio de diferentes cortes de amostras, que são coletadas e desinfestadas previamente, podendo ser raízes, caule, folhas ou ainda outras partes, dependendo da planta de interesse. Essas amostras passam por um processo rigoroso de desinfestação superficial e profunda antes da execução dos cortes para prospecção do microrganismo de interesse. A amostragem pode ter diferentes delineamentos e de acordo com o interesse da pesquisa. Essas amostras podem ser coletadas nos mais diversos nichos e épocas do ano e em diferentes biomas, áreas agrícolas e em ambientes aquáticos. Quanto à identificação, geralmente é realizada com base em características morfológicas (macroscópicas e microscópicas) e, principalmente, por meio da identificação molecular (Arnold, 2007; Bruck, 2010; Araújo, 2002; Mello, 2011).

O sequenciamento genético é uma das ferramentas mais importantes para confirmar a identificação de espécies de diversos reinos, incluindo o Reino Fungi. Isso facilita

e garante o conhecimento da diversidade genética e de populações desses microrganismos com o mínimo de erro (Jaccoud-Filho et al., 2002; Tasiar; Ruthes, 2022; Torres et al., 2022).

3.2 Fungos edáficos

Fungos edáficos são aqueles que habitam o solo. Em geral, esses fungos se desenvolvem em ambientes com pH entre 5,0 e 7,0. No entanto, existem os extremófilos que podem habitar solos mais ácidos ou alcalinos, suportando faixas de pH com extremos entre 2,0 e 9,0. Em relação à umidade, preferem ambientes com variação entre 60% e 70% e, além disso, toleram diferentes faixas de temperatura, obviamente, dependendo da espécie (Dionisio et al., 2016). Esses fungos também contribuem para a composição da biomassa microbiana no solo, cerca de 70% a 80%, podendo atingir até 5t ha (Araújo et al., 2020; Schmidell; Zanfonato, 2021; Mendonça et al., 2023).

Concomitantemente ao surgimento das primeiras plantas terrestres, ocorreram também associações entre plantas e microrganismos (Martin; Uroz; Barker, 2017). Os fungos micorrízicos arbusculares foram os primeiros simbiontes micorrízicos a surgirem e tiveram apenas um único ponto de origem na história evolutiva; os demais foram originados em seguida ao longo dos períodos geológicos (Brundrett; Tedersoo, 2018). Esses fungos também são considerados endofíticos das raízes e aumentam a absorção de nutrientes para as plantas, através da expansão das hifas no solo, explorando áreas onde raízes não alcançam (Entry et al., 2002). São considerados os principais gêneros de fungos edáficos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. e *Rhizoctonia* sp. (Dresch et al., 2019).

No solo também são encontrados aqueles com potencial de patogenicidade, como o fungo *Beauveria bassiana*, que é um exemplo clássico encontrado em solos, causando infecções em diferentes hospedeiros. Essa infecção é chamada de epizootia, que é a capacidade de se disseminar e infectar boa parte da população de insetos e outros artrópodes que vivem no solo, de maneira ocasional e rápida, auxiliando no controle natural de pragas (Herrera; Salamanca, 1993; Alves, 1998; Batista-Filho, 2006; Saito; Marumoto, 2002; Koziol; Bever, 2016).

Além disso, os fungos edáficos são também importantes indicadores da qualidade do solo, pois sua presença e diversidade refletem as condições físicas, químicas e biológicas do ambiente. Esses fungos, assim como os fungos endofíticos, podem ser usados em diversas aplicações, dependendo da cepa e dos seus subprodutos. Podem também ser

usados na biorremediação de solos contaminados ou em processo de desertificação e no controle de pragas (Noda, 2009; Mohammadi et al., 2011; Kalsoom et al., 2020).

Tanto fungos edáficos quanto os endofíticos são promissores por produzirem benefícios às plantas, incluindo o controle de pragas, visto que novas cepas mais virulentas podem ser coletadas e identificadas. Assim, pode ser justificável a realização de mais pesquisas para prospecção desses microrganismos, tendo em vista os avanços e demandas para novos bioformulados com alta eficiência em campo, quer sejam para melhoria da sanidade das plantas ou para o controle de pragas.

3.3 Análise macroscópica

A análise macroscópica dos fungos tem por objetivo identificar a possibilidade de detecção de espécies por meio da observação de sinais visíveis a olho nu, tais como coloração, topografia, textura e demais características das colônias fúngicas produzidas em meios de cultivo artificiais em laboratório. Para tanto, observa-se fatores tais como: forma, cor, textura e tamanho das estruturas fúngicas desenvolvidas (Moreira, 2022).

A identificação macroscópica de fungos, quer endofíticos, edáficos ou de outra origem, no entanto, pode se tornar demorada, trabalhosa e complexa devido aos mecanismos de plasticidade fenotípica, peculiar a cada microrganismo, que é a capacidade que um organismo possui para modificar sua expressão fenotípica em resposta a diferentes condições ambientais (Slepecky; Starmer, 2009; O'Keefe, 2017; Hokken et al., 2019; De Carvalho; Pereira, 2017). Esta é influenciada pela relação entre a planta e o fungo e por fatores ambientais, incluindo a disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura, umidade e estresse abiótico, manejo da cultura, entre outros fatores como a composição do meio de cultura utilizado no processo de prospecção e isolamento (Guimarães et al., 2024).

Um fungo endofítico ou edáfico pode alterar a produção de metabólitos secundários em resposta à presença de nutrientes específicos ou à interação com diferentes espécies de plantas hospedeiras. Assim sendo, as diferenças nas colorações das colônias podem ter variações para o mesmo fungo, fator que pode levar a dúvidas na determinação das espécies (Rho et al., 2017; Moreira, 2022).

Também, a capacidade de adaptação por meio da plasticidade fenotípica pode ser vantajosa para a sobrevivência dos fungos, pois lhes permite sobreviver às diversidades das condições ambientais, expressando cores e tamanhos de estruturas diferenciadas, mas que

garantem a sobrevivência da espécie em diferentes condições ambientais (Hokken et al., 2017).

A identificação macroscópica, em geral, é o ponto de partida para selecionar amostras para análise molecular mais detalhada. Portanto, a abordagem macroscópica, combinada com técnicas de identificação molecular, proporciona uma compreensão completa e precisa na determinação de cada espécie.

3.4 Análise molecular

A identificação precisa de espécies fúngicas é importante e necessária em diversos campos: na medicina, para determinar a melhor forma de sanar ou controlar uma doença; na ecologia, com o objetivo de identificar a diversidade; e na agricultura, para identificar cepas com potencial para o controle biológico de pragas e doenças de plantas. Além disso, ela permite o desenvolvimento de técnicas de cultivo e extração mais eficazes para a produção dos diferentes compostos de interesse (De Carvalho e Pereira, 2017).

A técnica mais amplamente empregada para a análise molecular de fungos endofíticos e edáficos é a amplificação das regiões internas transcritas (ITS 1, 2 ou 4) do DNA ribossomal (rDNA). Essas regiões são altamente conservadas entre os fungos, o que permite a utilização de primers universais para sua amplificação (Schoch et al., 2012). No entanto, as variações presentes em sequências específicas dessas regiões permitem uma discriminação precisa entre diferentes espécies, facilitando a identificação taxonômica. A região ITS é especialmente valiosa devido à sua capacidade de refletir a diversidade genética e a evolução dos fungos, sendo considerada uma das principais marcas moleculares em estudos filogenéticos. Além disso, a análise de sequências de ITS possibilita não apenas a identificação de espécies conhecidas, mas também a descoberta de novas espécies, contribuindo significativamente para a compreensão da biodiversidade fúngica e suas interações ecológicas (Fungaro, 2000). O uso de técnicas complementares, como sequenciamento de nova geração (NGS) e análises filogenéticas, pode ainda aprimorar a resolução taxonômica, oferecendo insights mais profundos sobre a diversidade funcional e as adaptações dos fungos em seus respectivos nichos ecológicos.

Outras técnicas moleculares, como a análise de marcadores de DNA mitocondrial, a análise de proteínas e a análise de perfis metabólicos, também podem ser usadas para a identificação de fungos e comparadas com bancos de dados de sequências

conhecidas, para identificar o microrganismo em nível de espécie (De Carvalho e Pereira, 2017).

As sequências de DNA amplificadas, em geral, são corrigidas por softwares específicos, como o Bioedit®, e permitem a identificação de espécies fúngicas com base na comparação com bancos de dados de sequências de referência, como o National Center for Biotechnology Information (NCBI). Além disso, outras técnicas moleculares, como a análise de marcadores de DNA mitocondrial, a análise de proteínas e a análise de perfis metabólicos, podem ser utilizadas para a identificação de fungos e comparadas com bancos de dados de sequências conhecidas, para a identificação do microrganismo em nível de espécie (De Carvalho e Pereira, 2017).

3.5 A cultura da cana-de-açúcar

Existem discussões acerca da origem da cana-de-açúcar (gênero *Saccharum*). Contudo, a planta é considerada originária das regiões tropicais do sudeste asiático, com seus centros de origem principais situados na Nova Guiné, no sul e sudeste da Ásia e em partes da Índia (Rodrigues et al., 2020). A domesticação da cana-de-açúcar começou há milhares de anos nessas áreas, onde populações locais descobriram o uso do caldo doce extraído das hastes da planta. Posteriormente, a cana foi introduzida em outras partes do mundo por rotas comerciais e coloniais, espalhando-se para a África, o Mediterrâneo e as Américas, onde se tornou uma das principais culturas agrícolas (Daniels; Roach, 1987).

O cultivo de cana-de-açúcar desempenha um papel de destaque na agricultura global, sendo uma atividade de grande importância econômica e industrial em várias regiões do mundo. Países como Brasil, Índia, China, Tailândia e Indonésia emergem como líderes na produção mundial de cana-de-açúcar, aproveitando as condições climáticas e de recursos humanos favoráveis encontradas em seus territórios (Rodrigues, 1995; Morais et al., 2015).

O Brasil e a Índia, em particular, se destacam como os principais produtores de cana-de-açúcar. A vasta extensão de terras cultiváveis nesses países, aliada ao clima tropical, oferece condições ideais para o crescimento exuberante da cultura. O Brasil, por exemplo, não apenas lidera a produção global de cana-de-açúcar, mas também é um dos principais produtores de etanol a partir da cana, impulsionando a indústria de biocombustíveis (Conab, 2023).

A cultura da cana-de-açúcar tem potencial para ser utilizada na produção de bioplásticos, biofibras e outros materiais biodegradáveis, além de representar uma importante fonte de recursos para exploração comercial, como a produção de açúcar, álcool, vinhaça, melaço e bagaço. Está também diretamente ligada às questões energéticas e à geração de combustíveis sustentáveis, contribuindo com a diminuição dos combustíveis derivados do petróleo (Silva et al., 2021; Valério, 2021; Schmidell; Zanfonato, 2021).

Ao longo dos séculos, a cana-de-açúcar ajudou a modificar a paisagem natural de diferentes regiões do país, influenciou a formação social e impulsionou a economia. Esse desenvolvimento histórico em território brasileiro teve destaque, especialmente em estados como São Paulo, Minas Gerais e Pernambuco (Rodrigues et al., 2020; Schmidell; Zanfonato, 2021).

Para a safra 2022/2023, a região Sudeste, que é a maior produtora de cana-de-açúcar do país, teve um aumento de produtividade de 5,8%, alcançando 75.629 kg/ha, seguida pelas regiões Centro-Oeste, com aumento de 5,7% em relação à safra anterior, Nordeste, com aumento de 9,4% e produção de 64.313 kg/ha, Sul, com 65.115 kg/ha, e Norte, que, apesar dos incrementos na área, teve a produção reduzida em 0,9% em relação à safra passada, produzindo 3.823 mil toneladas. A produção total foi estimada em 37 milhões de toneladas de açúcar, com um acréscimo de 6% em relação à safra anterior (Conab, 2023).

Entre os estados que se destacaram no desenvolvimento da cultura da cana-de-açúcar no Brasil, São Paulo ocupa um lugar de destaque no cenário brasileiro e global. A região responde por 60% da safra do país (Conab, 2024). A trajetória de sucesso da cana-de-açúcar em São Paulo é exemplo de como a inovação pode impulsionar a produção agrícola. Um dos pilares do destaque de produtividade da cana-de-açúcar em São Paulo é o investimento em pesquisa e desenvolvimento. Instituições de pesquisa, universidades e empresas privadas têm se dedicado a melhorar variedades de cana-de-açúcar, buscando plantas mais resistentes a pragas, doenças e condições adversas. Essa abordagem resultou no desenvolvimento de variedades de alta produtividade, capazes de se adaptar às diferentes regiões do estado (Figueira, 2020; Antunes et al., 2023; Speranza et al., 2023).

A mecanização das operações, o uso de sistemas de irrigação eficientes e a aplicação de técnicas modernas de manejo têm contribuído para maximizar a produção e otimizar os recursos disponíveis nas usinas. A automação de processos também permitiu uma gestão mais precisa das operações, resultando em ganhos de eficiência. A gestão inteligente dos recursos naturais também tem sido um fator relevante para o sucesso da produtividade da

cana-de-açúcar em São Paulo, pois, além de atender aos quesitos da legislação ambiental vigente, agrega valor ao produto (Baccarin, 2016; Fredo, 2017).

No estado de São Paulo, o tradicional método de queima na pré-colheita não é mais permitido. Esta mudança decorre da Lei Estadual nº 11.241/2002, que proíbe a queima do canavial na pré-colheita. A lei visa contribuir para a diminuição da emissão de poluentes prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente e é de grande relevância para a economia paulista (Ribeiro; Ficarelli, 2010; Silva; Périco, 2022).

Assim como para qualquer cultura, na cana-de-açúcar, a compreensão da fenologia da planta é importante para otimizar o manejo e a produção. A cana-de-açúcar é uma planta da família das gramíneas (Poaceae) e é amplamente cultivada em países de clima tropical. Trata-se de uma planta perene que cresce em solos bem drenados e ricos em nutrientes, sendo capaz de tolerar condições de seca e altas temperaturas, mas é sensível a geadas e frio intenso. As principais fases fenológicas da cana-de-açúcar são: brotação, quando os primeiros brotos começam a surgir da base do colmo; fase de perfilhamento, quando ocorrem as brotações e começam a se multiplicar e formar perfilhos; o alongamento dos colmos, quando há o crescimento dos colmos; e, por último, a fase de maturação (Figura 02).

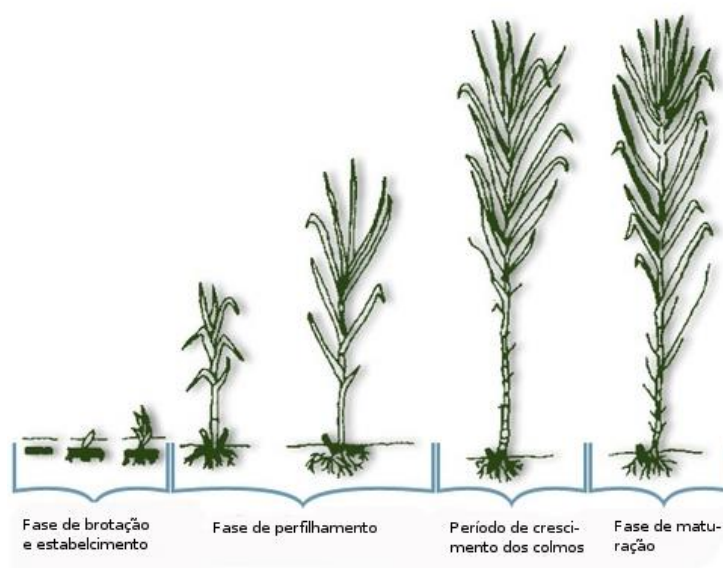


Figura 02. Fases da fenologia da cana de açúcar. Adaptada de: Gasho e Shin, 1983.

Quando os colmos começam a se desenvolver verticalmente, tornando-se mais espessos e acumulando açúcar, segue-se o período de maturação, que é quando a cana atinge o teor máximo de açúcar. Nessa fase, inicia-se o período de colheita (Gascho, 1983; Suguitani; Matsuoka, 2001; Scarpari; Beauclair, 2008; Miranda, 2008).

O tempo de duração de cada fase fenológica pode variar dependendo das condições climáticas, do manejo da cultura e da variedade de cana-de-açúcar utilizada. É importante monitorar as fases fenológicas da cana-de-açúcar para determinar o momento ideal de realizar o manejo e a colheita, visando a obtenção de uma produção de qualidade e a diminuição de custos na fase de reforma do canavial, incluindo as providências contra pragas (Bolonhezi; Pereira, 1999).

3.5.1 Pragas da cana-de-açúcar

Apesar do Brasil ser o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, existem problemas que causam perdas econômicas, com a queda de produtividade, que pode variar entre as safras. Um dos fatores responsáveis por esses problemas são as pragas agrícolas. Uma grande variedade de insetos tem sido identificada como pragas que afetam essa cultura, exigindo estratégias cada vez mais eficazes dentro do manejo integrado de pragas (Rodrigues et al., 2020).

Pragas que habitam os solos são de difícil controle devido às dificuldades de observação direta, pois algumas possuem ciclos de vida holometábolos e hábitos crípticos. Entre essas pragas, algumas se destacam: a cigarrinha-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*), que suga a seiva das raízes das plantas, causando amarelamento, murcha, e auxiliando no agravamento de doenças, podendo até levar à morte das plantas; os cupins dos gêneros *Heterotermes* (Isoptera: Rhinotermitidae), *Procornitermes* (Isoptera: Termitidae) e *Neocapritermes* (Isoptera: Termitidae); o besouro da raiz da cana-de-açúcar (*Migdolus fryanus*) e o bicudo-da-cana-de-açúcar (*Sphenophorus levis*) (Dinardo-Miranda, 2008).

O manejo de pragas na cultura da cana-de-açúcar envolve uma combinação de técnicas que visam equilibrar a proteção das plantações com a preservação do meio ambiente e a minimização de gastos com a produção. O controle biológico, o uso de variedades melhoradas geneticamente (para maior resistência a intempéries e doenças), e a implementação de práticas culturais sustentáveis, como o uso de produtos à base de microrganismos, são abordagens eficazes que contribuem para a manutenção da saúde das plantas e a otimização da produção das lavouras (Almeida, 2005; Toledo et al., 2011).

Mudanças nos processos de manejo da cultura da cana-de-açúcar, como no caso de São Paulo, onde a proibição da queima do canavial antes da colheita é lei, facilita o

aumento de problemas relacionados às pragas, uma vez que haverá maior disponibilidade de alimento para esses insetos (Almeida, 2005; Baccarin, 2016; Fredo, 2017).

Assim, controlar as pragas agrícolas abaixo do nível de dano econômico é um desafio constante para os produtores, exigindo abordagens integradas de manejo para minimizar seus impactos na produtividade e na qualidade da cultura (Parra et al., 2002). Entre as pragas citadas anteriormente, *S. levis* tem sido considerado o de maior importância para a cultura (Dinardo-Miranda; Fracasso, 2013). Dessa forma, o controle de pragas na cultura da cana-de-açúcar ainda demanda continuidade nas pesquisas em busca de inovação nos bioprodutos, visando manter a boa saúde das plantações e garantir uma produção com danos abaixo do nível econômico, além de ser mais sustentável.

3.5.2 *Sphenophorus levis*, Vaurie 1978 (Coleoptera: Curculionidae)

O gênero *Sphenophorus* (Coleoptera: Curculionidae) possui uma grande variedade de espécies. Essas espécies danificam gramíneas de diversos centros de origem, incluindo a cana-de-açúcar (Tavares et al., 2009; Canassa, 2014; Vinha, 2020). O besouro causa danos abaixo do nível do solo e atinge o interior da planta. No estágio larval, há a busca por abrigo e alimento. Este comportamento gera a formação de galerias nos colmos, o que dificulta a distribuição dos nutrientes (Figura 03). Além disso, gera sintomas característicos, como amarelamento e secagem das folhas, o que prejudica drasticamente a rebrota da planta nos anos seguintes, gerando aumento de custos (Degaspari et al., 1987; Giometti et al., 2011; Rinke et al., 2011; Casteliani et al., 2020).



Figura 03 – Larva de *Sphenophorus levis*: a. na base da cana, b. dano no colmo. Imagem: Pereira, R.M.C., 2023.

Adultos de *S. levis* apresentam dois picos populacionais ao longo do ano, sendo um entre os meses de fevereiro e março e outro entre os meses de outubro e novembro. Há dimorfismo sexual em *S. levis*, caracterizado principalmente pela diferença no tamanho corporal (Figura 04). A fêmea é maior que o macho, podendo medir entre 1,2 e 2,0 cm, com coloração marrom escuro e manchas pretas sobre o dorso (Precetti; Teran, 1983; Izeppi, 2015).

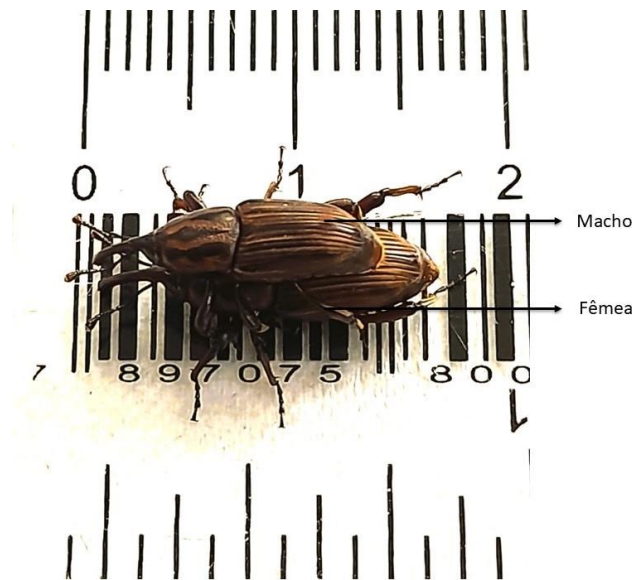


Figura 04 – Dimorfismo sexual em adultos de *Sphenophorus levis*. Imagem Pereira, R.M.C., 2024.

Seu ciclo de vida é holometábolo e possui quatro fases (Figura 05): ovo (período de incubação entre 7 e 12 dias), larva (com duração de 30 a 60 dias), pupa (duração de 5 a 13 dias) e adultos, com média de longevidade em 203 dias para machos e 224 dias para fêmeas (Precetti; Arrigoni, 1990; Leite et al., 2006).



Figura 05 – Fases do ciclo de vida de *Sphenophorus levis*: a. ovo; b. larva; c. pupa; d. adulto. Fonte: imagens a, b e c: Costa, V. A., Martins, L. F., 2018; imagem d. Pereira, R.M.C., 2023.

O besouro apresenta hábito noturno e é pouco ágil em sua mobilidade, além de possuir a estratégia de simulação de morte quando tocado (tanatose). Em campo, os adultos se encontram abaixo do nível do solo, geralmente nas brotações e raízes, podendo também permanecer nos restos vegetais, o que facilita a sua permanência na cultura. Em relação à dispersão no campo, mesmo os besouros adultos possuindo asas, têm baixa capacidade de voo e, basicamente, o seu deslocamento é realizado por caminhar. O deslocamento do macho pode chegar a 3 m/dia¹ (metros por dia) e o da fêmea até 5 m/dia¹, com capacidade de infestar 167,4 ha/ano, o que justifica mais pesquisas em busca de inovações para o controle desse coleóptero (Precetti; Teran, 1983; Casteliani et al., 2020).

3.6 Fermentação líquida submersa – FLS

Os primórdios da fermentação remontam às primeiras civilizações, quando práticas de fermentação eram empregadas na produção de alimentos como pão, cerveja e queijo. No entanto, foi somente no século XX que a fermentação líquida submersa (FLS) começou a ser explorada de forma sistemática como uma técnica de cultivo de microrganismos em larga escala (Alves, 1992; Vandenberghe, 2003; Alterthum et al., 2021).

No Brasil, o desenvolvimento da FLS teve amplo crescimento, especialmente a partir da década de 1970, quando a pesquisa científica e tecnológica passou a receber maior atenção devido ao sucesso na produção de etanol a partir da fermentação de matérias-primas como a cana-de-açúcar. Além disso, avanços significativos foram alcançados na produção de enzimas, como proteases e lipases, com aplicações na indústria de diversos setores, incluindo alimentos, detergentes, biocombustíveis e biocontrole (Leite, 2003; Farinas, 2015; Alterthum et al., 2021).

A fermentação líquida submersa (FLS) é amplamente estudada e aplicada globalmente, tanto em ambientes acadêmicos quanto industriais, com o objetivo de produzir uma vasta gama de metabólitos secundários a partir de diferentes microrganismos. Este processo envolve a utilização de cultivos microbianos submersos em meio líquido, onde condições ambientais, como pH, temperatura, oxigênio dissolvido e nutrientes, são rigorosamente controladas para otimizar a produção de compostos de interesse. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada na indústria da panificação e na indústria

de bebidas. Muito utilizadas em processos fermentativos industriais por meio da FLS são as bactérias, como *Bacillus thuringiensis*, conhecida por sua aplicação na produção de bioinseticidas. Este microrganismo é cultivado em fermentação líquida para gerar proteínas cristalinas com atividade inseticida específica contra determinadas pragas agrícolas, sendo amplamente utilizado no controle biológico de insetos. Além disso, *B. thuringiensis* e outras espécies do gênero *Bacillus* são frequentemente utilizadas na produção de bioinoculantes, que são produtos biológicos aplicados ao solo ou às plantas para promover o crescimento vegetal e a saúde do solo, além de serem alternativas sustentáveis aos fertilizantes e pesticidas químicos. No Brasil, assim como em outras partes do mundo, o desenvolvimento da FLS tem sido impulsionado por avanços científicos e tecnológicos, resultando em bons resultados e contribuindo para o progresso e inovação nos bioprocessos (Jackson; Mascarin, 2015; Mascarin; Jaronski, 2016; Alterthum et al., 2021).

Métodos de pesquisa variados foram empregados ao longo dos anos nos processos sob fermentação líquida, incluindo estudos de otimização de meios de cultura, modelagem matemática, desenvolvimento de diferentes Erlenmeyers e biorreatores e técnicas analíticas avançadas. Esses estudos são de grande importância, pois geram inovação e proporcionam o desenvolvimento de produtos comercialmente viáveis derivados da FLS (Mascarin et al., 2019; Alterthum, 2021).

3.7 Desenvolvimento de meio de cultura líquido

Com o objetivo de otimizar a produção de microrganismos e visando inovação e garantia de bioprodutos de eficiência no controle biológico de pragas, o desenvolvimento de meios de cultura para fermentação líquida para o crescimento e produção de fungos, bactérias e nematoides têm sido objeto de estudos em diferentes institutos de pesquisa e universidades (Mascarin et al., 2019).

A produção desses microrganismos em grande escala para uso comercial requer o desenvolvimento de meios de cultura eficientes para obter alta produtividade e qualidade das células de interesse. Nesse sentido, o processo de seleção de meio de cultura para produção de fungos entomopatogênicos é fundamental, pois a composição do meio pode afetar a produção das células desses microrganismos, tanto no tamanho e capacidade de virulência quanto na quantidade de biomassa e na produção de metabólitos de interesse (Batista-Filho et al., 1985; Alves, 1992; Mascarin et al., 2014). Dessa forma, ensaios seletivos

ou "screening" do meio de cultura são importantes para identificar o melhor meio de cultura para a produção desses microrganismos, visando maior concentração de células e outras condições que permitam a produção em larga escala e boa aplicação em campo.

Para a realização dos ensaios seletivos, é necessário um bom balanceamento dos componentes do meio de cultura. Essa etapa é de grande importância para o sucesso da produção das células, que no caso dos fungos, são os blastosporos, já que a proporção dos nutrientes afeta diretamente seu crescimento e desenvolvimento (Mascarin et al., 2019).

Na seleção de novos meios de cultura para cultivo submerso de fungos entomopatogênicos, a fonte de carbono deve ser o principal componente, pois fornece o elemento mais importante para a construção das células, o carbono. Este compõe cerca de 50% da biomassa seca, além de fornecer a energia necessária para o metabolismo do microrganismo (Kampen, 2014; Cojanu; Lumînare, 2021).

Na formulação de meio de cultura para fermentação líquida submersa de fungos entomopatogênicos, uma variedade de sais e nutrientes pode ser empregada para garantir um ambiente propício ao crescimento e desenvolvimento das cepas. Entre os sais minerais comumente utilizados, destacam-se: nitrato de sódio (NaNO_3), cloreto de potássio (KCL), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), sulfato de magnésio (MgSO_4), sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), sulfato de manganês heptahidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e cloreto de cálcio (CaCl_2) (Jackson et al., 2012; Mascarin et al., 2015; Parveen; Jeyarani; Jayapradha, 2021).

Um exemplo da importância da composição da fórmula é o cloreto de cálcio. Ele é frequentemente incluído no meio de cultura devido ao seu papel na manutenção da integridade da parede celular e na regulação osmótica das células fúngicas. A presença de cálcio também pode influenciar a produção de esporos e a resistência do fungo a condições adversas do ambiente (Mascarin et al., 2014; Alterthum et al., 2021; Yousef-Yousef et al., 2022).

Para suprir as necessidades de vitaminas, pode-se incluir a adição de complexos vitamínicos que podem conter substâncias tais como: tiamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{OS}^+$), riboflavina ($\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$), pantotenato de cálcio ($\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{CaN}_2\text{O}_{10}$), niacina ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$), piridoxamina ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$), ácido fólico ($\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6$), biotina ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$) e B12 ($\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{CoN}_{14}\text{O}_{14}\text{P}$), que desempenham papéis vitais como cofatores em diversas reações metabólicas, contribuindo para o crescimento e metabolismo adequados dos fungos entomopatogênicos (Jackson et al., 2012, Mascarin et al., 2014).

Além dos nutrientes mencionados, outros compostos podem ser adicionados ao meio de cultura para promover o crescimento e a produção de metabólitos específicos. Por exemplo, aminoácidos como glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$) e alanina ($C_3H_7NO_2$) podem ser suplementados para auxiliar na síntese proteica e na produção de toxinas fúngicas com potencial inseticida (Jackson; Jaronski, 2012; Alterthum et al., 2021).

No caso dos fungos entomopatogênicos, meios de cultura inovadores ainda são alvo de pesquisas, pois, além da migração da fermentação sólida em arroz parboilizado, a FLS ainda é relativamente nova para a otimização na produção desses microrganismos. Há um crescimento no segmento, visando também as vantagens que o processo permite: maior facilidade de padronização do processo, permitindo a multiplicação das células blastospóricas (blastosporos ou blastoconídios) em um menor período, além das garantias de um produto com boa aplicabilidade e eficiência (Ortiz-Urquiza et al., 2010; Mascarin, 2014; Yousef-Yousef et al., 2022).

3.8 Biorreatores de bancada

No Brasil, o uso de biorreatores de bancada tem ganhado destaque nos últimos anos, uma vez que a pesquisa em controle biológico de pragas com a utilização de fermentação líquida submersa tem se intensificado. A busca por inovação e a necessidade de produção com qualidade, eficiência e menor tempo de produção, passível de escalonamento, tem despertado o interesse de diversas empresas. Este cenário contribui para o engajamento de instituições de pesquisa e universidades na apresentação de projetos de grande porte, com investimentos na aquisição e desenvolvimento desses equipamentos para apoiar estudos avançados sobre a produção de agentes de controle biológico (Almeida, 2020; Alterthum et al., 2021).

Os biorreatores, em geral, são compostos por diversas peças, como a torre de comandos, que é onde se faz a programação dos parâmetros desejados; as bombas peristálticas, que são responsáveis por bombear os componentes para dentro do vaso contendo o meio de cultura; o sistema de resfriamento por meio do chiller e condensador; as portas de entrada na tampa do vaso ou dorna; e demais componentes como mangueiras, filtros e cabos. Entretanto, essenciais e de maior importância para o desempenho de sucesso na produção por FLS, estão o sistema de agitação, que pode incluir diferentes formatos de impelidores, além

de variação na rotação por minuto (RPM), sendo estes responsáveis por manter o meio de cultura homogeneizado e garantir uma distribuição uniforme de nutrientes e oxigênio aos microrganismos em crescimento (Alterthum et al., 2021; Yousef-Yousef et al., 2022). Um dos impelidores mais utilizados em biorreatores de bancada pode ser composto por seis a oito pás planas e é conhecido como turbina de Rushton (RT). Este tipo de impelidor é montado radialmente, verticalmente ao longo do eixo de agitação, proporcionando agitação radial unidirecional do fluxo do meio (Figura 06).

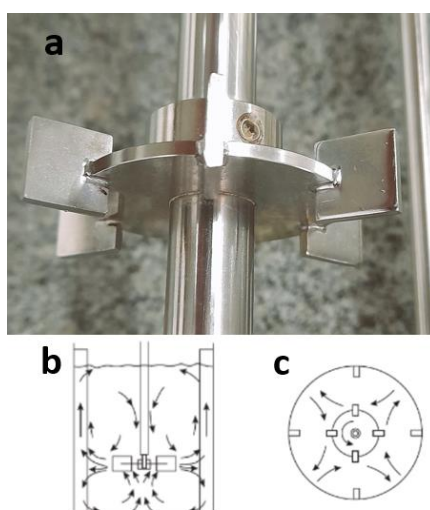


Figura 06 – Impelidor para biorreator de bancada: a) turbina de Rushton; b) fluxo em relação ao vaso; C: movimento em relação às Chicanas. Imagem: a = Pereira, RM.C., 2023, b e c adaptada de Alterthum, 2021.

Outros componentes de grande importância para o cultivo das células fúngicas ou de outros microrganismos em biorreatores, sejam eles de bancada, piloto ou industrial, são: a sonda de pH, que é importante para a detecção de maior ou menor entrada de ácidos e bases; a sonda de temperatura, que permite a autorregulação por meio do controle termostático, utilizando o chiller (banho termostático) e o condensador; a sonda de pO₂, que mede a pressão do ar no interior do vaso (Mascarin et al, 2019; Tonso et al, 2021; Alterthum et al., 2021)

Além disso, existem diferentes tipos de biorreatores de bancada, que podem atender a diferentes demandas em relação ao custo-benefício e à eficiência nos bioprocessos. Esses equipamentos podem funcionar em diferentes configurações: em coluna de bolhas, airlift de cilindros, airlift split-cylinder, entre outros (Figura 07).

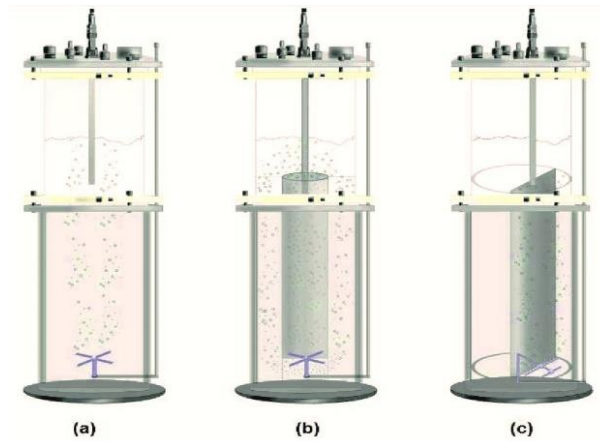


Figura 07– Tipos de biorreatores: a: coluna de bolhas, b: airlift de cilindros concêntricos e c: airlift split-cylinder. Imagem adaptada de Mendes, 2016.

Além desses, um modelo bastante utilizado é o biorreator “Stirred Tank Reactor” (STR), também conhecido como tanque agitado (Figura 08).



Figura 08– Biorreatores tipo Stirred Tank Reactor – STR com fermentação do meio T1.S.II-2023 de *Metarhizium anisopliae* IBCB383. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.

Oferecendo vantagens significativas em relação à escalabilidade dos processos de fermentação, os biorreatores de bancada proporcionam resultados que podem ser extrapolados para biorreatores maiores, como os pilotos, considerados aqueles com

capacidade entre 50 e 500 L, e os utilizados em escala industrial, considerados acima de 500 L (Figura 09).

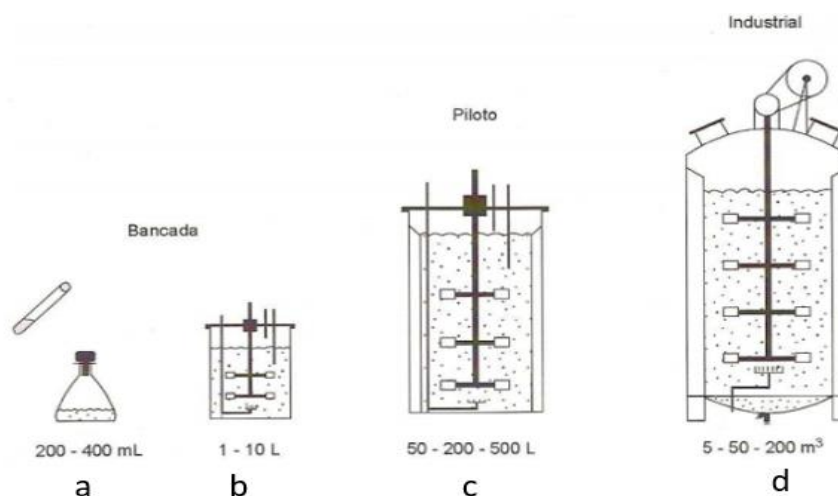


Figura 09 – Biorreatores em escalonamento: a) inóculos em Erlenmeyers, b) produção em biorreator de bancada, c) biorreator de escala piloto e d) biorreator de escala industrial. Imagem adaptada de: profissãobiotec.com.br, 2018.

Dessa forma, esse processo de escalabilidade é fundamental para a viabilidade econômica e a comercialização dos produtos de controle biológico com base em microrganismos produzidos pelo processo de fermentação líquida submersa (Mascarin et al., 2015; Tonso, 2021).

Outro aspecto importante para os trabalhos desenvolvidos com biorreatores de bancada é a possibilidade de controlar parâmetros como o potencial de hidrogênio (pH). Dessa maneira, a proporção ideal da concentração de substâncias, tais como ácidos e bases, para controlar o pH durante a fermentação líquida submersa (FLS) de um fungo entomopatogênico pode variar dependendo do tipo de fungo, do meio de cultivo e das condições específicas do processo de fermentação (Jackson e Jaronski, 2012; Mascarin et al., 2015).

A escolha da faixa ideal do pH deve ser a melhor possível, conforme a necessidade do microrganismo alvo. Além disso, a escolha do agente de controle (ácidos e bases) e a titulação são condições específicas para o bom desempenho do meio na produção da concentração ideal, sendo importante realizar ajustes e otimizações com base nos resultados dos testes (Mascarin et al., 2015; Alterthum et al., 2021).

Além disso, os biorreatores de bancada desempenham um papel importante na pesquisa acerca do comportamento e produção de metabólitos secundários dos agentes de controle biológico. Ao estudar diferentes meios de cultura, bem como veículos de formulação, como os adjuvantes, surfactantes, entre outros, com o uso dos biorreatores, é possível o desenvolvimento de produtos mais estáveis, eficazes e práticos para uso no campo, que podem ser aplicados de forma eficiente e segura, maximizando o impacto no controle de pragas agrícolas (Tonso et al., 2021).

Assim, os trabalhos desenvolvidos com biorreatores de bancada representam uma contribuição significativa para o avanço da ciência e tecnologia no campo do controle biológico de pragas. Ao combinar conhecimentos de microbiologia, engenharia de processos e biotecnologia, os desafios estão sendo vencidos, transformando a maneira como enfrentamos os problemas das pragas agrícolas (Mascarin et al., 2019; Almeida, 2020; Yousef-Yousef et al., 2022).

3.9. Bioinseticidas no controle biológico

Nos últimos anos, apesar do crescimento contínuo na utilização de bioprodutos em relação aos produtos químicos na agricultura brasileira, o uso dos bioinseticidas ainda é tímido em relação à quantidade de hectares que poderiam ser tratados pela utilização de agentes de controle biológico. Conforme dados da Agrofit, em março de 2024, o Brasil possui registro de um total de 785 biopesticidas, sendo: 295 inseticidas microbiológicos, 114 fungicidas microbiológicos, 78 nematicidas microbiológicos, 53 acaricidas microbiológicos, 5 bactericidas microbiológicos, 94 agentes biológicos de controle e 48 à base de feromônios.

Bioinseticidas que possuem microrganismos, como os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, são os mais comuns e representam uma alternativa promissora aos pesticidas sintéticos no controle de pragas agrícolas (Almeida; Batista-Filho, 2016; Mascarin; Pauli, 2010; Pereira; Almeida; Batista-Filho, 2023). No entanto, a eficácia desses agentes biológicos está ligada aos tipos de formulações, bem como aos métodos de produção e às estruturas fúngicas utilizadas (conídios aéreos ou blastosporos), método de aplicação em campo e às condições climáticas, que podem influenciar sua viabilidade, dispersão, persistência e capacidade de controle das pragas-alvo (Alves, 1998; Soza-Gomes, 2010; Acheampong et al., 2020; Maruyama et al., 2020; Felizatti et al., 2021; Spletzer, 2021).

Apesar das vantagens já demonstradas pela adoção dos bioprodutos e do crescimento na adoção desses por parte dos produtores, os meios de aplicação ainda continuam sendo os mesmos utilizados para as caldas convencionais aplicadas aos agroquímicos (Pereira; Almeida; Batista-Filho, 2021). Um dos métodos mais comuns de aplicação é a pulverização. Este método é amplamente utilizado devido à sua praticidade e eficácia em atingir as partes aéreas das culturas, onde muitas pragas se alimentam ou se abrigam. No entanto, este método perde a eficiência no caso de enfrentamento aos insetos de hábitos crípticos. Assim, dentro do conceito de manejo integrado de pragas (MIP), diferentes tipos de controle aplicados a uma praga podem proporcionar maior eficiência, principalmente naqueles insetos-praga com hábitos crípticos. No caso do controle de *Sphenophorus levis*, a combinação de dois ou mais métodos pode ser promissora (Carvalho; Barcelos, 2012; Bitsadze et al., 2013).

Outros métodos de aplicação de bioinseticidas têm sido explorados, como a aplicação líquida diretamente no solo, que, em alguns casos, como na cultura da cana-de-açúcar, é realizada juntamente às soqueiras no momento do corte. Técnica que, apesar de não ser específica para o uso de microrganismos, tem sido bastante utilizada visando à economia de mão de obra. Este tipo de aplicação envolve a incorporação do agente biológico no solo próximo às raízes das plantas hospedeiras, visando atingir aquelas pragas que se alimentam das raízes ou do sistema radicular (Custodio et al., 2017). O controle por meio de iscas e armadilhas também é eficiente para insetos-praga de hábitos subterrâneos. Em geral, esses dispositivos utilizam combinações de atrativos para atrair os insetos-alvo para um substrato contendo o bioinseticida, onde são infectados (Brilhante et al., 2022).

Apesar dos avanços nas pesquisas para o desenvolvimento de bioinseticidas, ainda existem desafios a serem superados para garantir sua eficácia e maior adoção em campo. Além das questões de registro e legislação, um dos principais desafios é a formulação do bioinseticida. Este deve levar em conta diferentes aspectos de maneira que o bioformulado permita maior tempo de estabilidade (shelf-life) e viabilidade durante os procedimentos e condições de armazenamento e transporte, garantindo assim a qualidade e eficiência do agente biológico no ambiente (Almeida, 2020; Pereira; Almeida; Batista-Filho, 2023). Assim, apesar do potencial dos bioinseticidas no controle das pragas agrícolas, ainda existem desafios a serem superados para garantir sua eficácia e adoção pelos produtores.

3.10. Fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos têm despertado crescente interesse na agricultura como uma alternativa sustentável e eficaz no controle de pragas. Estes organismos apresentam a capacidade de infectar e matar insetos, oferecendo uma abordagem biológica para o manejo integrado de pragas (Alves, 1998; Pereira; Almeida; Batista-Filho, 2021; Pereira; Almeida; Batista-Filho, 2023).

No contexto da cultura da cana-de-açúcar, o *bicudo-da-cana-de-açúcar* (*Sphenophorus levis*) representa uma ameaça significativa, e os fungos entomopatogênicos, como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, têm sido estudados como soluções para reduzir danos às plantações (Almeida et al., 2005; Brilhante et al., 2022). Estes fungos são eficazes no controle de pragas como o *bicudo-da-cana-de-açúcar* na fase adulta, impedindo ou minimizando sua reprodução (Alves, 1998; Alves et al., 2008; Vinha et al., 2019). De acordo com o Ibama, as cepas *B. bassiana* CAS-63428-82-0 e *M. anisopliae* CAS-67892-13-1 têm baixo risco toxicológico para humanos, animais e o meio ambiente, desde que utilizadas de forma apropriada. Esses fungos são agentes de biocontrole amplamente aplicados na agricultura para o controle de insetos e ácaros, sendo específicos para as pragas-alvo.

As cepas de fungos entomopatogênicos são isoladas de diversas fontes, como solos, plantas e insetos, refletindo a biodiversidade natural, onde esses fungos evoluíram ao longo de milhões de anos em um processo complexo de adaptações e seleção natural. Tais cepas apresentam características genéticas e bioquímicas distintas conforme a região geográfica de origem (Alves, 1998; Batista-Filho et al., 2016; Mascarin et al., 2016). O entendimento da origem e evolução desses fungos é essencial para a pesquisa, visto que *B. bassiana* e *M. anisopliae* são exemplos notáveis de microorganismos com alta capacidade entomopatogênica, amplamente usados em biopesticidas (Mascarin et al., 2016; Bernardo et al., 2020).

O fungo *B. bassiana*, um organismo polífago, pode infectar diversos hospedeiros de diferentes ordens, sendo descrito por Agostino Bassi no século XIX. Classificado dentro do reino Fungi, *B. bassiana* pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales, família Cordycipitaceae, gênero *Beauveria* e espécie *Beauveria bassiana* (Mascarin et al., 2015; Oliveira et al., 2015; Bernardo et al., 2020). Já *M. anisopliae*, com maior especificidade para insetos da ordem Coleoptera, como besouros e suas larvas, também é utilizado globalmente no controle de pragas (Oliveira et al., 2015; Marciano et al., 2021). Dentro do reino Fungi, *M. anisopliae* é classificado no filo Ascomycota, classe

Sordariomycetes, ordem Hypocreales, família Clavicipitaceae, gênero *Metarhizium* e espécie *Metarhizium anisopliae* (Ibama, 2019).

Ambos os fungos possuem adaptações bioquímicas (como quitinases) e morfológicas (como plasticidade fenotípica), permitindo-lhes colonizar e infectar hospedeiros com eficácia. Eles produzem estruturas especializadas, como conídios aéreos (em fermentação sólida) e blastosporos (em fermentação líquida), além de hifas e microescleródios (Yousef-Yousef et al., 2022). Essas estruturas variam conforme a espécie e são essenciais para o ciclo de vida e infecção nas pragas. Os fungos, entomopatogênicos, também possuem mecanismos que superam as defesas dos insetos e causam doenças (Mascarin e Jaronski, 2016; Marciano et al., 2021).

A capacidade desses fungos de infectar insetos e sobreviver em diferentes ambientes foi crucial para sua disseminação e sucesso como agentes de biocontrole. As relações patógeno-hospedeiro são complexas e fundamentais para a bioecologia de cada microrganismo, sendo amplamente estudadas para aprimorar a eficácia no manejo integrado de pragas (Alves, 1998; Oliveira et al., 2015; Mascarin e Jaronski, 2016).

O conhecimento sobre a origem das cepas é essencial, pois permite detectar fatores que influenciam suas características genéticas e bioquímicas, impactando sua adaptação a diferentes condições ambientais e sua eficiência no processo infectivo. (Driver, 2000). A seleção das cepas é, no entanto, apenas um dos fatores determinantes para o sucesso do controle biológico de insetos. A formulação do produto e a estratégia de aplicação são igualmente importantes para garantir a eficácia do uso de fungos entomopatogênicos (Mascarin et al., 2019; Pereira et al., 2021).

3.11 Uso de blastosporos como bioinseticida

Blastosporos ou blastoconídios são estruturas unicelulares de reprodução assexuada encontradas em fungos entomopatogênicos. São células vegetativas, semelhantes a leveduras, apresentam formas arredondadas ou ovaladas, dependendo da espécie de fungo (Figura 10).



Figura 10 – Em destaque blastosporos do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB383 coletados de amostra de fermentação do biorreator 72h, em câmara de Neubauer na diluição 10^{-1} e sob microscópio óptico em 400x. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.

Em geral, os blastosporos ou blastoconídios são formados na hemocele do hospedeiro durante uma das fases do processo infeccioso. Essas estruturas podem ser produzidas em meio de cultura líquido que simule a hemocele do hospedeiro. Mais recentemente, visando à produção de novos formulados para bioinseticidas, estas células têm despertado interesse e expectativas relacionadas às questões de inovação para produção e inserção de bioinseticidas no mercado (Mascarin et al., 2019; Bernardo et al., 2020). As células blastospóricas (blastosporos ou blastoconídios) são responsáveis pela infecção e colonização do corpo do hospedeiro e, posteriormente, pela disseminação da doença (Figura 11).

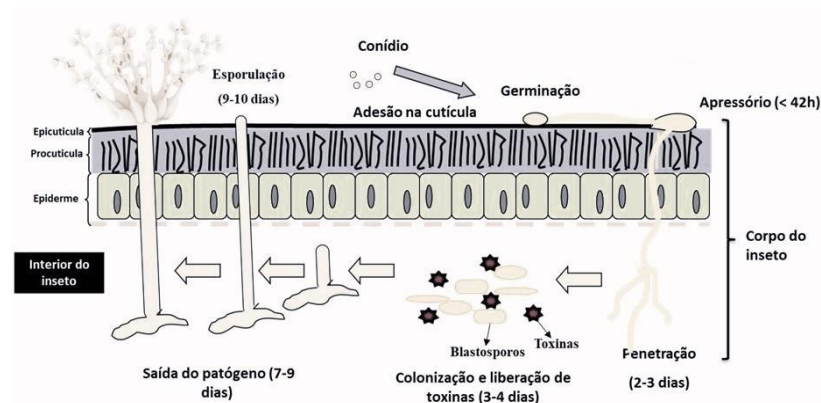


Figura 11 – Processo infeccioso após adesão do fungo entomopatogênico em hospedeiro. Imagem adaptada de Mascarin e Jaronski, 2016

Essas células têm sido estudadas pelo fato de apresentarem boa capacidade infectiva, mas enfrentam desafios para formulação devido à sensibilidade de sua estrutura membranosa, que difere dos conídios aéreos, os quais contêm quitina em sua estrutura de resistência (Ottati-de-Lima, 2010; Mascarin; Jaronski, 2016).

A eficácia dos blastosporos de fungos entomopatogênicos no controle de pragas agrícolas está relacionada à sua capacidade infectiva. Entretanto, sua capacidade de penetrar na cutícula dos insetos, como o mecanismo utilizado pela estrutura conídio aéreo, ainda é investigada. Quer por conídios aéreos ou por blastosporos, uma vez infectado, o fungo se multiplica rapidamente, colonizando o inseto e causando sua morte em poucos dias. Esse mecanismo de ação específico torna os bioinseticidas à base de fungos uma alternativa altamente seletiva e segura em comparação com outros métodos de controle de pragas (Alves, 1998; Ottati-de-Lima, 2010; Mascarin et al., 2014).

Esses bioinseticidas são considerados uma ferramenta importante no manejo integrado de pragas, complementando o uso de pesticidas químicos e promovendo uma abordagem mais sustentável e equilibrada para a proteção das lavouras (Mascarin et al., 2014).

Um dos desafios enfrentados na aplicação de bioinseticidas à base de blastosporos de fungos entomopatogênicos é a necessidade de otimizar as condições de cultivo e formulação para garantir a viabilidade e eficácia dos microrganismos no campo. Pesquisas ainda são necessárias para desenvolver formulações estáveis e de alta qualidade que possam ser aplicadas de forma eficaz em diferentes condições ambientais, principalmente no território brasileiro, onde há grande variação climática, quer seja nos biomas, nas transições entre eles, nos microbiomas específicos de cada cultura, ou ainda em função da

biodiversidade (Ottati-de-Lima, 2010; Parra, 2002; Mascarin et al., 2019; Bernardo et al., 2020).

Além disso, o repasse do conhecimento produzido nas pesquisas científicas e a conscientização dos agricultores sobre os benefícios e o uso adequado de bioinseticidas à base de fungos entomopatogênicos são fundamentais para a credibilidade da eficiência do controle biológico. Esse ciclo permite a continuidade das pesquisas e do desenvolvimento de novas formulações e inovações para uma agricultura mais sustentável e resiliente aos desafios futuros.

3.12 Controle de pragas com bioinseticidas

O uso de bioinseticidas no Brasil tem crescido significativamente, refletindo uma tendência global de busca por alternativas mais sustentáveis e menos agressivas ao meio ambiente em comparação aos pesticidas químicos convencionais (CropLife, 2024). O país, com sua vasta agricultura e biodiversidade, é um dos principais mercados para bioinseticidas e tem registrado uma taxa de crescimento anual expressiva, impulsionada pela demanda por práticas agrícolas mais ecológicas e pela pressão regulatória sobre o uso de agroquímicos tradicionais (Bortolotti; Martins, 2022).

Em grandes culturas, como as de soja, milho, algodão, cana-de-açúcar e frutas, incluindo laranja e uva, os bioinseticidas estão entre os produtos mais utilizados no Brasil. O controle de pragas em culturas orgânicas e em sistemas de produção integrada também tem impulsionado o crescimento desse mercado (Thayná et al., 2021).

Conforme informações da CropLife Brasil (safra 2023/2024), os bioinsumos são uma aposta crescente na agricultura brasileira, com um aumento de 15% nas vendas na safra 2023/2024, somando R\$ 5 bilhões. Globalmente, espera-se um crescimento anual de 13% a 14% até 2032, chegando a US\$ 45 bilhões, três vezes o valor atual. Os produtos de controle biológico lideram o segmento, representando 57% desse mercado e devem permanecer como a maior parcela.

A utilização de bioinseticidas para o controle biológico de *S. levis*, conhecido como bicudo-da-cana-de-açúcar, tem sido objeto de estudo e pesquisa ao longo dos anos. Desde a década de 1950, o controle biológico já era utilizado no manejo de pragas da cana-de-açúcar. Mais especificamente, em 1974, houve intensificação dessa prática, quando foi

introduzida a *Cotesia flavipes* para o controle da broca-da-cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Mendonça, 1996; Pereira; Santos, 2022).

Outro exemplo clássico de controle de pragas na cultura da cana-de-açúcar é o caso da cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata*, cujo sucesso no controle foi obtido por meio da aplicação do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Alves et al., 2008). Devido à extensão das áreas de plantio, até 2013, esses dois tipos de biocontroladores eram os mais utilizados (Parra et al., 2010; Pinto et al., 2013).

Estudos com a utilização do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* e de nematoides entomopatogênicos para controle de *S. levis* também têm apresentado resultados promissores. O mesmo pode ser dito para o uso de bactérias entomopatogênicas, principalmente *Bacillus thuringiensis*, que, após experimentos com larvas de *S. levis*, mostraram resultados satisfatórios para o controle dessa praga (Polanczyk, et al., 2004; Leite et al., 2006; Tavares et al., 2007; Cícero et al., 2009; Giometti et al., 2011; Leite et al., 2012; Pereira; Santos, 2022).

Conforme Badilla e Alves (1991), a utilização de iscas tóxicas com o fungo entomopatogênico *B. bassiana* apresentou resultados de mortalidade em cerca de 92%. Ainda sobre o tipo de formulação, alguns estudos demonstraram a eficiência de *B. bassiana* no controle de *S. levis* em campo e laboratório, quando aplicados na forma líquida ou granulada (Salvador; Neto, 2012). Estudos com nematoides entomopatogênicos têm mostrado bons resultados no controle da fase larval (Leite et al., 2006).

Assim, pode-se concluir que o potencial dos bioinseticidas à base de fungos entomopatogênicos no controle biológico de *S. levis* na cultura da cana-de-açúcar é promissor. No entanto, é necessário continuar investindo em pesquisa e desenvolvimento para otimizar as formulações e os métodos de aplicação, visando maximizar a eficácia e a sustentabilidade do controle biológico de *S. levis* em campos de cana-de-açúcar.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHEAMPONG., M. A. et al. (2020). UV sensitivity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates under investigation as potential biological control agents in South African citrus orchards. **Fungal Biology**, 124(5), 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.08.009>
- ALMEIDA, J. E. M. de. Biofábricas para produção de micopesticidas no Brasil: oportunidades de negócio e inovações / Bio-factories for the production of mycopesticides in Brazil: business opportunities and innovations. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 2444–2557, 2020. DOI: 10.34188/bjaerv3n3-162. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJAER/article/view/16950>. Acesso em: 14 mar. 2024.
- AGROFIT, Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Consulta de pragas, doenças e produtos indicados**. Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 18 jul. 2024.
- ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. Controle Biológico da Cigarrinha-da-Raiz da Cana-de-Açúcar com o Fungo *Metarhizium anisopliae*. Boletim Técnico do Instituto Biológico, n.16, São Paulo: **Instituto Biológico**, 2006, 19 p.
- ALTERTHUM, F. et al. Biotecnologia Industrial. **Fundamentos**, v. 1, 2.ed., p. 15- 51, 2021.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**, 2.ed. Piracicaba: Fealq, 1998. p.289-381.
- ALVES, S.B. et al. **Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina**. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B (Eds.). Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba: Fealq, 2008. p.69-110.
- ALVES, S. B. Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 13, p. 77-86, 1992.
- ANTUNES, J. F. G.; et al., **Comparação de Safras de Cana-de-açúcar por meio de Perfis Temporais de Índices de Vegetação MODIS da API SATVeg no Ambiente QGIS**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROINFORMÁTICA (SBIAGRO), 14. , 2023, Natal/RN. **Anais [...]**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Computação, 2023 . p. 159-166. ISSN 2177-9724. DOI: <https://doi.org/10.5753/sbiagro.2023.26554>.
- ANYASI, R. O.; ATAGANA, H. I. Endophyte: Understanding the microbes and its applications. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 4, p. 154-167, 2019.
- ARAÚJO et al., I. D. S., (2020). *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. vs. *Mucuna pruriens* (L.) DC.: efeito do cultivo de espécies de plantas não leguminosas e leguminosas sobre a comunidade de fungos micorrízicos nativos de solos arenosos. **Acta Biológica Catarinense**, 7(2), 48-57.
- ARAÚJO, W. L. et al. **Manual de Isolamento de microrganismos endofíticos**. Esalq, Piracicaba, 2002, 86 p.

ARAÚJO, W.L., et al, Variability and interactions between Endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 51-66, 2007.

AZEVEDO, E. , BARATA, M. (2018) Diversidade no reino Fungi e aplicações à Indústria, **Rev. Ciência Elem.**, V6(04):077. doi.org/10.24927/rce 2018.077

AZEVEDO, J.L.; et al. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: Serafini LA, Barros MN, Azevedo JL (eds) *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*: avanços na agricultura e na agroindústria, 1st ed. eDUCS, Caxias do Sul, p. 233–268, 2002.

BACCARIN, J. G. **A indústria abarca a cana-de-açúcar e corta rente o trabalho volante: mudanças tecnológicas recentes na lavoura canavieira e impactos na ocupação agrícola do Estado de São Paulo**. 2016. 188 f. Tese (Livre-docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.

BADILLA, F.; ALVES, S.B. Control del picudo de lacaña de azúcar *Sphenophorus levis* Vauire (Col.: Curculionidae) con *Beauveria bassiana* y *Beauveria brogniartii* en condiciones de laboratorio y campo. **Revista Interamericana de Ciencias Agrícolas**, [s. 1], p. 237-247, 1991.

BASSO, Vanessa et al. High concentration of spores and colony forming units of the biocontrol agent *Beauveria bassiana* via optimization of submerged cultivation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 47, p. 102607, 2023.

BATISTA-FILHO, A. et al.,(1985), Crescimento de *Beauveria* sp., isolado de bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman), em meios de cultura naturais, líquidos. **O Biológico**, 51, 17-21

BATISTA-FILHO, A. Inimigos Naturais – Fungos Entomopatogênicos. **Guia de Sanidade Vegetal**.16/04/2016 Disponível em:<
http://www.sica.bio.br/guiabiologico/busca_inimigos_resultado_ok.php?Id=9&Vlt=11&busca=Fungos%20Entomopatog%C3%AAnicos>. Acesso em: 16 maio 2022.

BATISTA FILHO, A. et al. Alternativa de controle: bicudo da cana-de-açúcar. 2006. Disponível em:<
<http://www.repositoriobiologico.com.br/jspui/bitstream/123456789/345/2/Alternativa%20de%20controle%20bicudo%20da%20canadea%C3%A7%C3%BAcar.pdf>> Acesso em: 07 set. 2024.

BERNARDI-WENZEL, L. et al., Isolamento e atividade antagonística de fungos endofíticos de soja (*Glycine max.* (L.) Merrill). **SaBios: Ver. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.86-96, set-dez, 2012. ISSN:1980-0002.

BERNARDO C. C. et al. (2020) Differential susceptibility of blastospores and aerial conidia of entomopathogenic fungi to heat and UV-B stresses. **Fungal biology**, v. 124, n. 8, p. 714-722, 2020.

BETTIOL, W . **Defensivos agrícolas naturais, uso e perspectivas**. 1 ed. Brasília, 2016

BETTIOL, W. (2019) et al. Uso atual e perspectivas do Trichoderma no Brasil. Meyer, MC; Mazaro, SM; Silva, JC Trichoderma: uso na agricultura. **Brasília: Embrapa**, p. 21-43.

BITSADZE, N. et al (2013). Joint action of *Beauveria bassiana* and the insect growth regulators diflubenzuron and novaluron, on the migratory locust, locustamigratoria. **Journal of Pest Science**, 86, 293-300.

BOGAS, A. C. et al., Endophytic fungi: an overview on biotechnological and agronomic potential Fungos endofíticos: uma visão geral sobre o potencial biotecnológico e agrônômico. **Brazilian Journal of Biology**, 2024, vol. 84, e258557 | <https://doi.org/10.1590/1519-6984.258557>

BOLONHEZI, D.; PEREIRA, J. C. V. N. A. Plantio direto na Alta Mogiana. **O Agrônômico**, Campinas, v. 51, p. 12-15, 1999.

BORSARI, A. P.; CLAUDINO, M. Biodefensivos: Mercado e percepção do produtor brasileiro. **Agroanalysis**, 32 – 37p., 2018. Disponível em: <file:///C:/Users/gesta/Downloads/agroanalysis_abcbio%20(3).pdf>. Acesso em: 10 jan. 2023.

BORTOLOTTI, G.; SAMPAIO, R. M. Demandas tecnológicas: os bioinsumos para controle biológico no Brasil. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 39, n. 1, p. 26927, 2022.

BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C.; LATGE, J. P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1795-1805, 1988.

BRILHANTE, F. D. et al., **REVISÃO DE LITERATURA**: Uso de *Beauveria bassiana* no controle biológico de *Sphenophorus levis* Vaurie 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar. Manejo de pragas e doenças: a busca por formas sustentáveis de controle. vol 2, n. 1, p. 133-150, 2022.

BRUCK, D.J. Fungal entomopathogens in the rhizosphere. **Biological Control**, Orlando, v.55,p. 103-112, 2010.

BRUNDRETT, M. C.; TEDERSOO, Leho. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. **New Phytologist**, v. 220, n. 4, p. 1108-1115, 2018.

BUTT, T. M., et al., **Degeneration of entomogenous fungi**. In J. Eilenberg & H. M. T. Hockkanen (Eds.), Na Ecological and societal approach to Biological Control, 2006, p. 213-226

CANASSA, F. **Distribuição espacial, efeito do manejo da palha pós-colheita e da aplicação de *Beauveria bassiana* (*Balsamo*) *Vuillemin* (Hupocreales: Cordycipitaceae) na ocorrência de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar**. 2014. 98 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2014.

CASTELIANI, A. F. et al., (2020) Behavioral aspects of *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), damage to sugarcane and its natural infection by *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Rhabditidae) **Crop Protection**, v. 137, p. 105262, 2020.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, 2013, 5 (3),

421-437. Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/e299986b-1407-4469-bc08-51480c60dc1e/content>> Acesso em: 22 de Ago. 2024.

CÍCERO, E.A.S.; FERRAUDO, A.S.; LEMOS, M.V.F.; Identificação de genes cry de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Sphenophorus levis*, o bicudo da cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 68, n. 4, p. 817-823, 2009.

COJANU, D. ; LUMÎNARE, C. M. Effect of different carbon and nitrogen sources on sporulation of *Beauveria bassiana* Romanian strains. **Romanian Journal for Plant Protection**, v. 11, p. 24-31, 2021.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Produção de cana-de-açúcar na safra 2023/24 chega a 713,2 milhões de toneladas, a maior da série histórica**

. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5489-producao-de-cana-de-acucar-na-safra-2023-24-chega-a-713-2-milhoes-de-toneladas-a-maior-da-serie-historica>>. Acesso em: 23 abr. 2024.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Produção de cana-de-açúcar é estimada em 689,8 milhões de toneladas na safra 2024/2025**. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5685-producao-de-cana-de-acucar-e-estimada-em-689-8-milhoes-de-toneladas-na-safra-2024-2025#:~:text=Com%20uma%20estimativa%20de%208,em%2079.953%20quilos%20por%20hectare.>>. Acesso em: 12 set. 2024.

CROPLIFE (CLB), **Mercado de bioinsumos cresceu 15% na safra 2023/2024**. Disponível em: < [Mercado de bioinsumos cresceu 15% na safra 2023/2024 - CropLife Brasil](#)>. Acesso em: 10 out.2024.

CUSTÓDIO, H. H.; MARTINELLI, P. R. P.; DOS SANTOS, L. S. Controle químico e biológico de *Sphenophorus levis* Vaurie (Coleoptera: Curculionidae) na cultura da cana-de-açúcar. **Entomol. Mex**, v. 4, p. 331-337, 2017.

CUZZI, C., et al., Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (ASTERAECEAE). **Global Science and Technology**, v. 04, n. 02, p.47-57, maio/ago. 2011.

DANIELS, J; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: **Developments in crop science**. Elsevier [s. n.], p. 7-84, 1987

DE CARVALHO, S.B. G., PEREIRA, M. C. Fungos endofíticos em raízes de *Prosthechea pachysepala* (Orchidaceae) da Serra do Cipó/MG. **Natureza Online**, v. 15, n. 1, p. 50-58, 2017. ISSN 1806-7409

DE-GASPARI, N. et al., Biologia de *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae) em dieta artificial e no campo. **Pesquisa Agropecuária do Brasil**, Brasília, v. 22, n. 6, p. 556-558, 1987.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Pragás. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, p. 349–404, 2008.

DRESCH, F.; LANA, D. F. D.; MACIEL, M. J. Avaliação das comunidades fúngicas encontradas em amostras de solo: uma revisão sistemática da literatura. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 6, p. 67-76, 2019. DOI: doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2019.006.0007

DRIVER, et al., taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological research**, v. 104, n. 2, p. 134-150, 2000.

EMBRAPA MEIO AMBIENTE, **Jornal do endofítico**, Disponível em: <<https://www.cnpma.embrapa.br/projetos/endofiticos/introducao.html>>. Acesso em: 11 de agosto, 2021.

ENTRY, J. A. et al. Influence of adverse soil conditions on the formation and function of arbuscular mycorrhizas. **Advances in Environmental Research**, v. 7, n. 1, p. 123–138, nov. 2002.

EVANGELISTA, E. F. D. et al. Controle químico de *Sphenophorus levis* Vaurie (Coleoptera: Curculionidae) na cultura da cana-de-açúcar. *Entomologia Mexicana*. Jaboticabal, 2017

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomassdegrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.

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

FELIZATT, A. P., et al., (2021). Encapsulation of *B. bassianain* Biopolymers: Improving Microbiology of Insect Pest Control. **Frontiers in Microbiology**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.704812>.

FIGUEIRA, S. R. F. Impactos dos preços e do crédito rural sobre a produção de cana-de-açúcar no estado de São Paulo. **Revista de economia e sociologia rural**, v. 58, 2020.

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e o papel do instituto agrônomo no seu estabelecimento no Brasil. In: DINARDO-MIRANDA, L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDEL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, p. 31-44, 2008.

FREDO, C. E.; CASER, D. V. Mecanização da colheita da cana-de-açúcar atinge 90% na safra 2016/17. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 12, n. 6, jun. 2016.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 14, p. 12-16, 2000.

GABARDO, G. et al. *Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* como antagonistas no crescimento de fungos fitopatogênicos in vitro. **Brazilian Journal of Development**. Curitiba, v. 6, n. 8, p. 55870-55885, 2020.

GASCHO, G. J.; SHIH, S. F. **Sugarcane**. In: TEARE, I. D.; PEET, M. M. (Ed.). *Crop-water relations*. New York: Wiley-Interscience, 1983. p. 445-479

GIOMETTI, F.H.C. et al., (2011). Virulência de nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) a *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae). **Bragantia**, 70: 81-86.

GUIMARÃES, J. J. do V. et al., Identificação e caracterização morfocultural de patógenos causadores de doenças foliares em mudas de açaizeiro provenientes de Moju/PA . **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 2559–2577, 2024. DOI: 10.34117/bjdv10n1-158.

HERRERA, M. A.; SALAMANCA, C. P.; BAREA, J. M. Inoculation of Woody Legumes with Selected Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobia To Recover Desertified Mediterranean Ecosystems. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 129- 13, 1993.

HOKKEN, M. W. J. et al. Phenotypic plasticity and the evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*; an expression profile of clinical isolates upon exposure to itraconazole. **BMC genomics**, v. 20, p. 1-17, 2019.

IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Perfil ambiental. *Metarhizium anisopliae* CAS 67892-13-1, 2019. Disponível em: https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/arquivos/perfis-ambientais/2019/Perfil%20Ambiental%20Metarhizium%20anisopliae_02_10_2019.pdf> Acesso em: 21 Mar. 2024.

IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Perfil ambiental. *Beauveria bassiana*, CAS 63428-82-0, 2019. Disponível em:< https://www.gov.br/ibama/pt-br/phocadownload/agrotoxicos/perfis-ambientais/2019/Perfil%20Ambiental%20Beauveria%20bassiana_02_10_2019.pdf> Acesso em: 21 de Set. 2024.

IZEPPI, T. S. **Distribuição espacial e dinâmica populacional de *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar**. 2015. Jaboticabal, 2015,iii, 74 p. : il. ; 28 cm, Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015.

JACCOUD FILHO D. S., Diagnose Molecular de Fungos em Sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**10, 287-331, 2002.

JACKSON M. A.; JARONSKI S. T. (2012) Desenvolvimento de processos de fermentação e estabilização em escala piloto para a produção de microescleródios do fungo entomopatogênico *Metarhizium brunneum* cepa F52. **Biocontrol Sci Tech** 22(8):915–930

JACKSON, M. A., MA, Mascarin, G. M. , 2015. Blastosporos fúngicos estáveis e métodos para sua produção, estabilização e uso. **Patente US20160075992**.

KALSOOM, M. et al. BIOLOGICAL IMPORTANCE OF MICROBES IN AGRICULTURE, FOOD AND PHARMACEUTICAL INDUSTRY: A REVIEW. Innovare **Journal of Life Sciences**, v. 8, n. 6, p. 1-4, 2020

KAMPEN, W. H. Nutritional requirements in fermentation. In: TODARO, C. C.; VOGEL, H. C. Fermentation and biochemical engineering handbook: principles, process design, and equipment. 3rd ed. Oxford: **William Andrew**, 2014. p. 37-57.

KOZIOL, L.; BEVER, J. D. The missing link in grassland restoration: arbuscular mycorrhizal fungi inoculation increases plant diversity and accelerates succession. **Journal of Applied Ecology**, v. 54. n. 5, 1301–1309, 2016. doi:10.1111/1365-2664.12843

LEITE, L. G. et al. Alternativa de controle: alternativa de controle. **Revista Cultivar**, [s.l.], p. 30-33, 2006.

LEITE, L.G. et al., (2012). Eficiência de nematoides entomopatogênicos e inseticidas químicos contra *Sphenophorus levis* e *Leucothyreus* sp. em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 42: 40-48. 29.

LUCIANO, D. de O. et al., *Bacillus* and *Trichoderma* as growth promoters of *Eucalyptus urograndis*. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. e11012239509, 2023. DOI: 10.33448/rsd-v12i2.39509. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/39509>. Acesso em: 20 mar. 2024.

MARCIANO, A. F. et al. Innovative granular formulation of *Metarhizium robertsii* microsclerotia and blastospores for cattle tick control. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 4972, 2021.

MARUYAMA, C. R., et al., (2020). Encapsulation of *Trichoderma harzianum* preserves enzymatic activity and enhances the potential for biological control. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 8,1–14. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00225>

MASCARIN, G. M. et al. (2014) Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 30, p. 1583-1590.

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

MASCARIN, G. M. et al., (2019). Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of invertebrate pathology**, 165, 46-53.

MASCARIN, G.M.; PAULI, G. **Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos**. In: Madelaine Venzon; Trazilbo José de Paula Júnior; Angelo Pallini. (Org.). Controle Alternativo de Pragas e Doenças na Agricultura Orgânica. 1 ed. Viçosa: U.R. EPAMIG ZM, 2010, v. 4, p. 169-195

MASCARIN, Gabriel Moura et al., Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and bioefficacy of blastospores. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, p. 6653-6665, 2015.

MASCARIN, Gabriel Moura et al., Phenotype responses to abiotic stresses, asexual reproduction and virulence among isolates of the entomopathogenic fungus *Cordyceps javanica* (Hypocreales: Cordycipitaceae). **Microbiological research**, v. 216, p. 12-22, 2018.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T., The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 1-26, 2016.

MELLO, S. C. M. Manual de Curadores de Germoplasma, Microorganismos: Fungos filamentosos. *In: Sueli Corrêa Marques de Mello, Ailton Reis e João Batista Tavares da Silva.* Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 25 p., 2011. (Documento técnico 134).

MENDONÇA, A.F. **Pragas da cana-de-açúcar.** Maceió: Insetos e Cia, 1996. 239p.

MENDONÇA, J. C. F. et al., Effect of eucalyptus sawdust biochar on the symbiosis of native arbuscular mycorrhizal fungi. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 1585–1595, 2023. DOI: 10.34188/bjaerv6n2-051. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJAER/article/view/60337>. Acesso em: 5 mar. 2024.

MICHEREFF FILHO, M. et al. MicoInseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas? **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 769-779, 2009.

MIRANDA, J.R. **História da cana-de-açúcar** – History of sugarcane. Campinas: Komedi, p.1-20, 2008.

MOHAMMADI, K. et al., Soil management, microorganisms and organic matter interactions: A review. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n.84, p. 19840-19849, 2011.

MORAIS, L. K. de et al. Melhoria Genética de Cana-de-açúcar. Embrapa Tabuleiros Costeiros. Aracaju: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **EMBRAPA / Circular Técnica**, n. 200, p. 092015.

MOREIRA, F. M. et al. Identificação de Fungos Filamentosos em Indústrias Farmacêuticas: uma revisão integrativa da literatura. **R. Científica UBM**, v. 24, n. 46, p. 124-144, 2022. DOI 10.52397/rcubm.v0in.46.1245. ISSN 2764-5185

NODA, Y. Las Micorrizas: Una alternativa de fertilización ecológica en los pastos. **Pastos y Forrajes**, Matanzas, v. 32, n. 2, p. 1, jun. 2009.

O'KEEFFE, Kayleigh R. et al. (2017) Plastic potential: how the phenotypes and adaptations of pathogens are influenced by microbial interactions within plants. **Current opinion in plant biology**, v. 38, p. 78-83.

OLIVEIRA, D.G. P. et al., A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. **Journal of microbiological methods**, v. 119, p. 44-52, 2015.

ORTIZ-URQUIZA, A. et al. (2010) Effects of cultural conditions on fungal biomass, blastospore yields and toxicity of fungal secreted proteins in batch cultures of *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales). **Pest Management Science**, v. 66, p. 725–735.

OTTATI-DE-LIMA, et al., (2010) Produção semissólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e temperatura sobre propágulos desses entomopatógenos. **Arq. Inst. Biológico**, v. 77, n. 4, p. 651-659, 2010.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. Biochemical , **Engineering journal**, v. 13, n. 2-3, p.81-84, 2003.

- PARRA, J. R. P. et al., (2002) Controle Biológico: uma revisão inter e multidisciplinar. **Controbiolog**, cap. 8, p. 125-142, 2002. Disponível em:<https://www.researchgate.net/profile/Jose_Mauricio_Bento/publication/318826649_Control_e_Biologico_Uma_Visao_Inter_e_Multidisciplinar_in_portuguese/links/5980804baca272ebd41cc037/Controle-Biologico-Uma-Visao-Inter-e-Multidisciplinar-in-portuguese.pdf>. Acesso em: 16 abr. 2023.
- PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; PINTO, A. S.; Controle biológico de pragas como um componente-chave para a produção sustentável de cana-de-açúcar. In: **Bioetanol de cana de açúcar - P&D para produtividade e sustentabilidade**[S.l: s.n.], 2010.
- HAN, P., et al., (2021). Two white collar proteins protect fungal cells from solar UV damage by their interactions with two photolyases in *Metarhizium robertsii*. **Environmental Microbiology**, 23(9):4925-4938. doi: 10.1111/1462-2920.15398.
- PEREIRA, S. D. G.; SANTOS, L. O. Revisão de literatura: Uso de *Beauveria bassiana* no controle biológico de *Sphenophorus levis* Vaurie 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar, **Científica Digital**, 2022. <https://doi.org/10.37885/220308014>
- PEREIRA, R.M.C.; ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. Applying different infective structures of *Beauveria bassiana* to *Coffea arabica* infested with *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) under field. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 89, 2023. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000182022>
- PIGNATI, W. A. et al. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 3281-3293, 2017.
- PINTO, A. de S.; LOPES, V.L.; LIMA, A.A. de. Manejo de pragas da cana-de-açúcar. In: SANTOS, F.; BORÉM, A. (Eds.). **Cana-de-açúcar: do plantio à colheita**. Viçosa: [s.E.], 2013. p.75-87.
- POLANCZYK, R. A. et al., (2004) Pragas de cana-de-açúcar x métodos alternativos de controle. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, p. 14-17, 2004.
- PRECETTI, A. A. C. M.; ARRIGONI, E. D. B. Aspectos bioecológicos e controle do besouro *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera, Curculionidae) em cana-de-açúcar. São Paulo: Copersucar, 1990. 15p. (**Boletim Técnico Copersucar – Edição Especial**).
- PRECETTI, A. A. C. M; TERAN, F. O. Gorgulhos da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978), e *Metamasius hemipterus* (I, 1765) (Coleoptera: Curculionidae). In: REUNIÃO TÉCNICA AGRONÔMICA: PRAGAS DA CANA-DE-AÇÚCAR, 1., 1983, Piracicaba, **Anais...** Piracicaba: Copresuca, p. 32-37, 1983.
- RHO, H. et al., Do endophytes promote growth of host plants under stress? A meta-analysis on plant stress mitigation by endophytes. **Microbial ecology**, v. 75, p. 407-418, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1054-3>
- RIBEIRO, H.; FICARELLI, T. R. A. Queimadas nos canaviais e perspectivas dos cortadores de cana-de-açúcar em Macatuba, São Paulo. **Saúde e Sociedade**. São Paulo, v.19, n.1, p.48-63, 2010.
- RODRIGUES, G. S. de S. C.; ROSS, J. L. S. **A trajetória da cana-de-açúcar no Brasil: perspectivas geográfica, histórica e ambiental**. Uberlândia: EDUFU, p. 07, 2020.

RODRIGUES, J. D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: Instituto de Biociências, Unesp, 1995. Disponível em: <
<http://www.camarasetorialdoleite.ms.gov.br/wpcontent/uploads/2016/03/Fisiologia-da-Cana-de-A%C3%A7%C3%BAcar.pdf>>. Acesso em: 15 fev 2021

RODRIGUES, G. S. S.; ROSS, J. L.S. **A trajetória da cana-de-açúcar no Brasil: perspectivas geográfica, histórica e ambiental**. Edufu, 2020. DOI:
<https://doi.org/10.14393/EDUFU/978-65-86084-00-9>.

SAIKKONEN, Kari et al. Evolution of endophyte–plant symbioses. **Trends in plant science**, v. 9, n. 6, p. 275-280, 2004.

SCARPARI, M. S.; BEAUCLAIR, E. G. F. Anatomia e Botânica. *In*: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 47–56, 2008.

SCHMIDELL, W.; ZANFONATO, K., *In*: Willibaldo et al. **Biotecnologia industrial-vol. 2: Engenharia bioquímica**. Editora Blucher, p. 06 – 90, 2021.

SILVA, E. A. R. et al., (2012) Seleção de isolados de fungos entomopatogênico para o controle de *Leptopharsa heveae* (Hemiptera: Heteroptera, Tingidae). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias, Botucatu, SP, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 79, n.4, p. 549 – 556.

SIVA, G. M. C. D., PÉRICO, A. E. Eficiência e sustentabilidade: uma análise econômica, social, ambiental e sustentável das usinas paulistas de cana de açúcar. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, 60(3), e238512, 2012, <https://doi.org/10.1590/1806-9479.2021.238512>

SILVA, R. A., et al., (2019). Efeito de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no controle de *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) na cultura da cana-de-açúcar. **Revista de Agricultura Neotropical**, 6(2), 1-12.

SLEPECKY, Ralph A.; STARMER, William T. Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. **Mycologia**, v. 101, n. 6, p. 823-832, 2009.

SPERANZA, E. A. et al., (2023) **Importância de índices de vegetação para modelos de estimativa de produtividade em cana-de-açúcar**. *In*: Anais do XX Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 02 a 05 de abril de 2023, Florianópolis, SC, ISBN-978-65-89159-04-9.

SPLETOZER, Aline Gonçalves et al. Plantas com potencial inseticida: enfoque em espécies amazônicas. **Ciência Florestal**, v. 31, p. 974-997, 2021.

SUGUITANI, C.; MATSUOSA, S. Efeitos do fósforo nas características industriais e na produtividade agrícola em cana-de-açúcar (cana-planta) cultivada em duas regiões do estado de São Paulo. *In*: **Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**. 2001. p. 119.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, p.448-459. 2001,

TAVARES, F.M. et al, (2017). Efeito de *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Nemata: Rhabditida) sobre larvas do bicudo da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), em laboratório e casa-de-vegetação. **Nematologia Brasileira**, 31: 12-19.

TONSO, A. et al., Tipos de biorreatores e formas de operação. **Biotecnologia Industrial: engenharia bioquímica**, v. 2, p. 109-126, 2021.

TOOFANEE, S. B.; DULYMAMODE, R. Fungal endophytes associated with *Cordemoya integrifolia*. **Fungal Diversity**, v. 11, n. 1, p. 169-175, 2002.

TORRES, F. L. et al., (2022) Bioprospecção e potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados a plantas do Cerrado. **Concilium**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 256–272, 2022. DOI: 10.53660/CLM-114-133. Disponível em: <http://clium.org/index.php/edicoes/article/view/114>. Acesso em: 5 mar. 2024.

ÚNICA – União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. 2024. Disponível em: <<https://unica.com.br/noticias/safra-2023-2024-termina-como-a-maior-da-historia/>>. Acesso em: 22 set. 2024.

VINHA, F.B. et al., (2020) ENTOMOPATHOGENIC FUNGI ON THE CONTROL OF *Sphenophorus levis* IN SUGARCANE CROP. V.19, n. 3, p 280-288, jul./sep. 2020.

VINHA, F. B.; RODRIGUES, L. R. ; DE SENE PINTO, A. Controle do Gorgulho-da-cana *Sphenophorus levis* com fungos entomopatogênicos em diferentes doses e formulações **Nucleus (16786602)**, v. 16, n. 1, 2019.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Report**, New York, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.

CAPÍTULO I

PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS E EDÁFICOS DA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR, E TESTES DE PATOGENICIDADE EM ADULTOS DE *Sphenophorus levis* EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de prospectar fungos endofíticos e edáficos de cana-de-açúcar e verificar o potencial entomopatogênico. As amostras foram coletadas em março e abril de 2022 com origem em três municípios do Estado de São Paulo. Foram realizadas duas coletas para cada propriedade totalizando seis coletas. Em cada coleta foram escolhidas e retiradas 10 plantas e 10 amostras do solo do entorno de cada planta. Todos os fungos prospectados foram codificados após avaliação macroscópica com posterior seleção e envio para a identificação molecular em nível de espécie. Foi realizado um teste de patogenicidade em larvas *Galleria mellonella* de diferentes instares e em adultos de *S. levis*. Para o teste com *G. mellonella* foram escolhidas 18 placas com diferentes morfotipos e colônias bem desenvolvidas nas quais foram colocadas cinco larvas que rastejaram por 60 segundos. Para a patogenicidade em adultos de *S. levis* foram realizados três experimentos com fungos endofíticos e três experimentos com fungos edáficos, sendo o método de aplicação por banho em 1 mL de suspensão fúngica por 60 segundos. Foram cinco tratamentos, incluindo a testemunha, com cinco repetições com cinco besouros em cada. Foi possível testar três fungos endofíticos com as concentrações variando entre 1×10^6 e 5×10^8 conídios/mL. A mortalidade foi avaliada por sete dias consecutivos com colocação dos insetos em câmara úmida para verificação de esporulação. Aos resultados foram aplicados testes ANOVA ou ANOVA de Welch seguidos do teste Tukey por meio do software RStudio®. Foi possível a classificação macroscópica de 480 isolados endofíticos 96 edáficos e a identificação molecular de 17 fungos. Em *G. mellonella*, a patogenicidade foi de 80 % para os morfotipos USAFC2A1, USJFC6B1, USJFC9C1. As maiores médias de mortalidades para *S. levis* foram: para o endofítico USARC10C2 com média de 4,0 para o fungo edáfico ATSC2C1 com 5,0.

Palavras-chave: potencial entomopatogênico. mortalidade. tratamentos. câmara úmida

ABSTRACT

The objective of this study was to prospect endophytic and edaphic fungi from sugarcane and evaluate their entomopathogenic potential. Samples were collected in March and April 2022 from three municipalities in the State of São Paulo. Two collections were carried out at each property, totaling six collections. For each collection, 10 plants and 10 soil samples surrounding each plant were selected and retrieved. All prospected fungi were coded after macroscopic evaluation, followed by selection and molecular identification at the species level. A pathogenicity test was conducted on *Galleria mellonella* larvae at different instar stages and on *Sphenophorus levis* adults. For the *G. mellonella* test, 18 plates containing different morphotypes and well-developed fungal colonies were selected, on which five larvae were placed to crawl for 60 seconds. For the pathogenicity test on *S. levis* adults, three experiments with endophytic fungi and three experiments with edaphic fungi were conducted, with the application method involving immersion in 1 mL of fungal suspension for 60 seconds. Five treatments, including a control, were performed, with five replicates containing five beetles each. It was possible to test three endophytic fungi with concentrations ranging from 1×10^6 to 5×10^8 conidia/mL. Mortality was assessed over seven consecutive days by placing the insects in a humid chamber to verify sporulation. The results were analyzed using ANOVA or Welch's ANOVA, followed by Tukey's test, through the RStudio® software. A total of 480 macroscopic classifications of endophytic isolates and 96 of edaphic isolates were obtained, with molecular identification performed on 17 fungi. For *G. mellonella*, pathogenicity reached 80% for the morphotypes USAFC2A1, USJFC6B1, and USJFC9C1. The highest average mortalities for *S. levis* were observed for the endophytic fungus USARC10C2, with an average of 4.0, and the edaphic fungus ATSC2C1, with an average of 5.0.

Keywords: entomopathogenic potential. mortality. treatments. humid chamber

5. INTRODUÇÃO

A introdução do termo endofítico na literatura de estudos de microrganismos surgiu da necessidade de descrever e entender a relação simbiótica entre organismos vivos que habitam o interior de plantas. Esse conceito tem suas raízes na ecologia e na microbiologia, buscando a compreensão da diversidade e da função dos microrganismos que têm seu habitat no interior das plantas. O termo foi utilizado pela primeira vez pelo microbiologista e micólogo alemão DeBary (1866), sendo inicialmente empregado para todos os microrganismos encontrados dentro de uma planta (Toofanee; Dulynamode, 2002).

Os organismos endofíticos passaram a ter maior atenção nas pesquisas a partir dos anos de 1970, por apresentarem propriedades com potenciais para proteção vegetal (Azevedo et al., 2002). Metabólitos desses organismos podem conter toxinas, antibióticos, antioxidantes, enzimas extracelulares, entre outras características que são de interesse para o desenvolvimento biotecnológico em segmentos importantes, tais como a indústria farmacêutica, a alimentícia e o setor agrícola. Além disso, a interação endofítico-hospedeiro pode proporcionar efeitos de resistência a doenças (alcaloides, flavonoides, diterpenos), repelência a insetos-praga, organismos patogênicos e até a herbívoros, o que tem levado ao aumento de pesquisas para a prospecção e identificação desses organismos (Azevedo, 1998; Zhang; Song; Tan, 2006; Cuzzi et al., 2011; Bernardi-Wenzel et al., 2012; Azevedo; Barata, 2018; Rho et al., 2018; Embrapa Meio Ambiente, 2021; Bogas et al., 2024).

Em geral, plantas que habitam nichos com maior diversidade de espécies tendem a possuir, igualmente, maior diversidade de endofíticos, podendo variar em função da localização geográfica, condições ecológicas, climáticas e sazonais (Hawksworth, 2001; Souza et al., 2019). Em estudos sobre a inserção de fungos endofíticos na composição de microrganismos que habitam as plantas, Hawksworth e Rossman (1997) sugeriram a existência de cerca de seis espécies de fungos por planta. No entanto, ao considerar os endofíticos como fungos habitantes das plantas, esse número aumentou para 33, confirmando a relevância dos endofíticos na composição da diversidade microbiana (Tan; Zou, 2001; Strobel et al., 2004). Em sistemas de monoculturas, como soja, eucalipto, café e cana-de-açúcar, as plantas podem apresentar endofíticos mais específicos, relacionados ao tipo de adubação e aos tratamentos culturais, tais como promotores de crescimento e entomopatógenos (Moreira; Siqueira, 2006; Forzza et al., 2010).

Os fungos edáficos são importantes habitantes do solo, desempenhando funções ecológicas relevantes, como a decomposição da matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes e a promoção do crescimento das plantas. Esses fungos são encontrados em quase todos os tipos de solos, desde desertos até florestas tropicais, e constituem uma parte essencial da biodiversidade do solo (Freitas et al., 2009). Além disso, podem formar associações simbióticas com raízes das plantas (micorrizas), auxiliando no crescimento e na saúde das plantas (Van Der Heijden et al., 2015; Santos et al., 2018).

A cultura da cana-de-açúcar é reconhecidamente uma das mais importantes em âmbito mundial. Além da produção de açúcar, a cultura está vinculada a questões energéticas e à inovação nos biocombustíveis. Apesar de sua relevância, mesmo com o desenvolvimento de espécies melhoradas ou organismos geneticamente modificados (OGM), a cultura ainda enfrenta ataques de pragas, como *Sphenophorus levis* (Casteliani, 2020).

O controle das pragas da cana-de-açúcar é, em geral, realizado com produtos químicos. No entanto, nos últimos anos, a adoção de bioprodutos para controle de doenças e pragas tem aumentado. Quanto ao uso de bioprodutos baseados em fungos entomopatogênicos, é mais comum a utilização de formulações em pó molhável, microencapsulados ou líquidos (Bittencourt et al., 2017; Almeida et al., 2020; Santos et al., 2018; Oliveira et al., 2021).

O controle biológico de pragas e doenças com base em fungos endofíticos ou edáficos ainda é uma área de pesquisa em desenvolvimento, com muitos desafios a serem enfrentados. A seleção de espécies de fungos com potencial de patogenicidade, a capacidade de multiplicação dos conídios, a produção em larga escala com concentrações efetivas no campo e a definição de formas eficazes e econômicas de aplicação no campo são aspectos que ainda necessitam de continuidade nas pesquisas (Almeida, 2020; Alterthum et al., 2021).

6. OBJETIVO

Prospecção de fungos endofíticos e edáficos de folhas, raízes e solo de cana-de-açúcar comercial e a verificação do potencial entomopatogênico em adultos de *Sphenophorus levis*.

7. MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Localização das coletas

Nos meses de março e abril de 2022, período chuvoso, foram realizadas duas coletas de solo em três regiões do Estado de São Paulo (Figura 12).

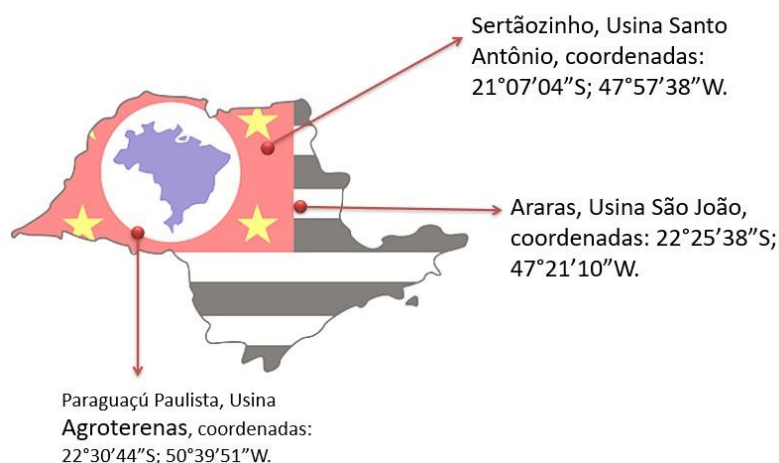


Figura 12 – Croqui de georreferenciamento dos três municípios do Estado de São Paulo, nos quais foram realizadas as coletas das amostras da cana-de-açúcar e solo. Imagem adaptada do google imagens. Fonte: Pereira, R.M.C., 2023.

Usina Santo Antônio – USA, localizada dentro da Fazenda Boa Esperança, Sertãozinho, São Paulo. O talhão escolhido foi o 24, possui também 24 ha e foi subdividido em uma área de 12,28 ha. A variedade da cana-de-açúcar foi a RB855156, de 3º corte. O índice de infestação por *S. levis* na época foi de 17%.

Usina São João – USJ, localizada dentro da Fazenda São João, s/– - Zona Rural, Araras, São Paulo. A área escolhida foi na zona 11004 e talhão 4 com área de 27,3ha. A variedade cultivada da cana-de-açúcar foi a SP-80-3280, sendo de 3º corte e o local na época da coleta apresentou índice de infestação por *S. levis* em 18%.

Agroterenas – AT, pertencente à Agroterenas S.A., Unidade de Maracaí, Paraguaçu Paulista, São Paulo. O talhão escolhido foi o 6 com 7,7 ha, com cultivo da cana-de-açúcar da variedade CTC9002, de 2º corte e índice de infestação por *S. levis* em 40% na época da coleta.

7.2 Prospecção de fungos endofíticos

As análises foram realizadas na Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico, do Instituto Biológico, Campinas, SP. Para a prospecção dos fungos endofíticos, foram usadas as classificações feitas no momento da coleta, com números de 1 a 10 para as plantas. Todas as amostras passaram primeiramente por desinfestação superficial, que consistiu em lavagem com detergente neutro e água corrente, visando à retirada de microrganismos epifíticos. Em seguida, foi realizado o processo de desinfestação profunda, que foi feito em fluxo laminar, com a imersão do material selecionado em álcool a 70% por 3 minutos, depois em imersão em hipoclorito de sódio com 2,5% de cloro ativo por 10 minutos, seguida de nova imersão em álcool a 70% por 1 minuto e, por fim, enxágue por duas vezes em água destilada autoclavada. Uma gota da última água do enxágue foi pipetada e disposta em uma placa de Petri contendo o meio BDA (batata-dextrose-ágar), a fim de verificar a eficácia da desinfestação (Figura 13).

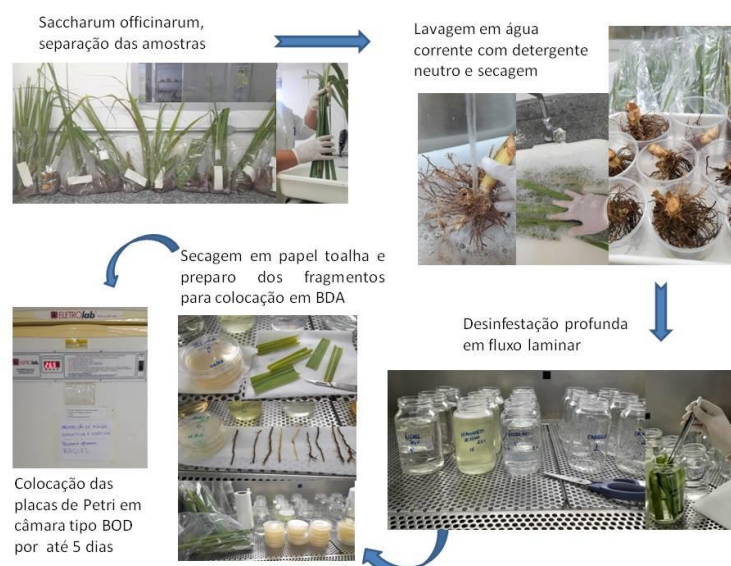


Figura 13 – Fluxograma de desinfestação profunda para extração de fungo endofítico. Imagem: Pereira, R.M.C., 2022.

Depois da desinfestação, fragmentos do material foram secos em papel toalha e, em seguida, passaram por cortes de maneira que permitissem a colocação de três fragmentos de cada estrutura (folha ou raiz) em cada placa de Petri com meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), cujo preparo foi de 500 mL de meio acrescido de 0,1 mg de Terramicina, com vistas a inibir o crescimento bacteriano. Então, os fragmentos foram depositados em três pontos, formando um triângulo, visando à facilitação da observação do crescimento dos possíveis fungos para a avaliação macroscópica. As placas com o material

foram armazenadas em câmara climatizada tipo BOD a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, com fotofase de 12 horas, por quatro a cinco dias, conforme o crescimento das colônias dos diferentes fungos. Cada placa foi identificada com a sigla da usina, o número da cana, a letra da repetição e o número referente ao fungo observado (Figura 14).

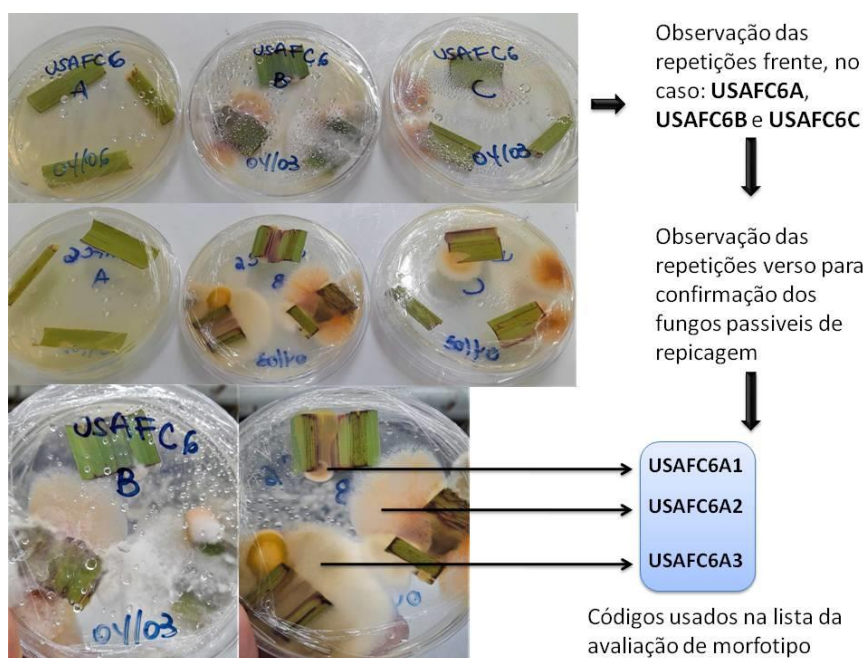


Figura 14 – Fluxograma para geração dos códigos para a classificação macroscópica dos fungos expressos após os fragmentos ficarem em BOD $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ e fotofase de 12 horas por quatro a cinco dias. Fonte: Pereira, R.M.C., 2023.

Após esta etapa, foi feita nova repicagem com o objetivo de isolar cada fungo. Foi realizada a avaliação das colônias dos isolados classificando os morfotipo em tabelas para facilitar a triagem para avaliação molecular.

7.3 Prospecção de fungos edáficos

As coletas seguiram os mesmos delineamentos de talhões e marcações utilizados nas coletas para raízes e folhas (pontos em linhas de cada talhão) para a prospecção dos fungos endofíticos. Foram coletadas 10 amostras de solo por talhão, em profundidade máxima de 15 cm, de forma a não ultrapassar o horizonte "O" do entorno de cada ponto/planta, com o auxílio de enxada, pá e espátula. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos com as devidas identificações, colocadas em caixas de isopor e, em seguida, levadas ao laboratório.

No laboratório, com o uso de peneira em aço inox e malha de 1,70 mm de abertura, inicialmente autoclavada, as amostras foram peneiradas com o objetivo de eliminar excesso de raízes e demais detritos. A peneira foi higienizada com álcool 70% e seca antes do processo de peneiramento da próxima amostra. De cada amostra peneirada, foram pesados 10 g e, em seguida, foi adicionado 90 mL de água destilada e autoclavada para início do processo de diluição seriada (Figura 15).



Figura 15 – Etapas de preparação de amostras de solo para posterior diluição seriada. Imagens: Pereira, R.M.C., 2022.

Com base em Chase, Osborn e Ferguson (1986) e Pinotti et al. (2011), para o isolamento e extração dos fungos edáficos, foram realizadas diluições seriadas de até 10^{-4} . O plaqueamento foi realizado em triplicata, com 100 μ L da suspensão fúngica da diluição 10^{-4} , dispostos em placas de Petri contendo meio de cultura preparado com: 20 g de aveia, 20 g de ágar, 0,2 mL de Triton, 5 mg de terramicina e violeta de genciana, com variação de 10 mL (coleta I) e 5 mL (coleta II) para 1 L de água deionizada e autoclavada.

As placas de Petri foram colocadas em câmara tipo BOD a $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 15 dias. Após esse período, foram feitas repicagens em meio BDA (batata-dextrose-ágar) com o objetivo de separar os fungos expressos. Essas placas também foram colocadas em câmara tipo BOD a $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por cinco dias. Após todo o processo de expressão dos fungos, foi feita a avaliação morfológica com vistas à classificação de morfotipos, sendo posteriormente selecionadas as que possuíam características diferenciadas e enviadas para análise molecular para identificação da espécie.

7.4 Análise macroscópica

Após as fases de coleta e demais procedimentos para a expressão fúngica, foi realizada a avaliação macroscópica para a classificação dos morfotipos. Com base em Carvalho e Pereira (2016), após a fase de incubação da repicagem I, a classificação dos fungos foi feita por meio de análise macroscópica, verificando os seguintes parâmetros: coloração da frente e verso, textura e topografia. Os registros das imagens foram feitos com um celular Samsung M12. Para a classificação da textura, observou-se a altura dos micélios aéreos, sendo a classificação dos mesmos a seguinte: algodonosa (micélio aéreo alto e denso), aveludada (micélio aéreo baixo), granular (superfície plana e esfarenta) e glabra (sem micélio aéreo/leveduras). Para a avaliação da topografia da colônia, os parâmetros utilizados foram: rugosa (sulcos profundos/raios a partir do centro), umbilicada (elevação central), plana (sem elevação, mas partindo do centro) e verrucosa (superfície franzida e retorcida). Todas as placas foram avaliadas e identificadas com um código para facilitar a condução dos trabalhos (Figura 16).

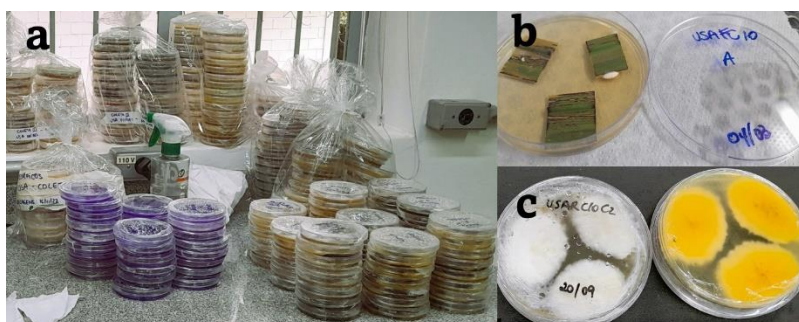


Figura 16 – Classificação macroscópica: a) placas com colônias das primeiras expressões; b) placa com expressão de fragmentos de folha; c) placas frente e verso com fungo da terceira repicagem da raiz. Imagens: Pereira, R.M.C., 2024.

7.5 Análise molecular e identificação de espécies

Para a análise molecular e identificação das espécies, após a seleção de cepas que apresentaram boa formação de colônias, incluindo as de código USARC10C2, USJFC6B1 e ATFC5A2, que demonstraram patogenicidade em larvas de *Galleria mellonella*, foram listados para envio para análise molecular 17 morfotipos, entre amostras de folha, raízes e solo, referentes às coletas I e II.

Os morfotipos foram repicados em tréplica, com colônias dispostas em três pontos, livres de contaminações e com cerca de 10 dias de cultivo, sendo então encaminhados em duplicata para empresa especializada em identificação molecular GoGenetic®. O método utilizado para a identificação por sequenciamento empregou marcadores comuns para os fungos: ITS (Internal Transcribed Spacer) e TEF (Elongation Factor 1-alpha).

Ao sequenciamento das bases, foi aplicado um procedimento de bioedição, sendo a determinação das espécies realizada por comparação dos resultados de cada sequenciamento por meio da National Library of Medicinal; National Center of Biotechnology Information (NCBI), Blast®.

7.6 Experimentos

Os experimentos foram realizados em laboratório, com um experimento envolvendo inseto-teste em larvas de *Galleria mellonella* de diferentes instares, além de experimentos com adultos de *Sphenophorus levis*.

7.6.1 Experimentos com inseto-teste *Galleria mellonella*

Testes em larvas de *G. mellonella*: após a observação macroscópica dos fungos prospectados e antes da análise molecular para a identificação das espécies, foram escolhidos alguns fungos para testes prévios com o objetivo de verificar possíveis cepas com potencial entomopatogênico. Entre os isolados não fastidiosos (aqueles que são difíceis de manipulação em laboratório) das coletas I e II, foram selecionadas 16 placas com colônias livres de contaminantes, que apresentaram boa coloração e esporulação, independentemente da identificação da espécie. Foram dispostas cinco larvas de *G. mellonella* em cada placa com o fungo escolhido. O método de contato utilizado foi o de rastejamento por 60 segundos (Figura 17).



Figura 17 – Larvas de *Galleria mellonella* em processo de rastejamento em placas com fungos endofíticos. Imagens: Pereira, R.M.C., 2023.

Para a avaliação da mortalidade, foi realizado um acompanhamento diário durante sete dias consecutivos. As larvas mortas foram colocadas em uma câmara úmida, montada com placas de Petri estéreis contendo um pedaço de algodão hidrófilo umedecido com água destilada, vedadas com plástico filme e dispostas em câmara climatizada tipo BOD, com temperatura a $26^{\circ}\text{C} \pm 1$, por até cinco dias.

7.6.2 Experimentos com adultos de *Sphenophorus levis*

Os fungos endofíticos com os códigos USARC10C2, USJFC6B1 e ATFC5A2, que apresentaram patogenicidade confirmada em *G. mellonella*, foram testados em adultos de *S. levis*. No experimento com larvas de *G. mellonella*, não foram utilizados fungos edáficos. Portanto, para os experimentos com *S. levis*, foram escolhidos dois isolados de fungos edáficos, de modo que não fossem semelhantes aos morfotipos de *B. bassiana* nem de *M. anisopliae*, com os seguintes códigos: USASC8A1 e ATSC2C1. O método de aplicação consistiu na disposição dos besouros em 1 mL de suspensão fúngica preparada com água por 60 segundos. Foram realizados cinco tratamentos, incluindo a testemunha, com cinco repetições e cinco besouros em cada repetição. Foi possível testar dois fungos endofíticos com concentrações entre 1×10^6 e 5×10^8 conídios/mL. A mortalidade foi avaliada durante sete dias consecutivos, com os insetos sendo colocados em uma câmara úmida feita com placas de Petri estéreis contendo um pedaço de algodão hidrófilo umedecido com água autoclavada, vedadas com plástico filme e dispostas em câmara climatizada tipo BOD, com temperatura a $26^{\circ}\text{C} \pm 1$, até apresentarem esporulação (Figura 18).



Figura 18 – Experimentos com *Sphenophorus levis*: a) Preparação e separação do material; b) verificação de sanidade e seleção dos insetos; c) separação das quantidades para cada experimento; d) material no fluxo laminar para aplicação das suspensões, em destaque o método de banho; e) colocação da dieta; f) avaliação da mortalidade e colocação em câmara úmida . Imagens: Pereira, R.M.C., 2024.

7.7 Análise estatística

Aos resultados dos experimentos com adultos de *S. levis*, foi aplicada ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) por meio do software RStudio®.

8. RESULTADOS

8.1 Prospecção de fungos endofíticos

Tanto para a coleta I quanto para a coleta II, após a observação e classificação morfológica macroscópica, foi possível o isolamento de um total de 576 fungos, sendo 480 endofíticos (de folhas e raízes) e 96 fungos edáficos (solo). Nesta etapa, foi possível observar os seguintes gêneros: *Beauveria* sp., *Cordyceps* sp., *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Metarhizium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp.

Para facilitar a identificação dos fungos prospectados em relação às amostras, após cada avaliação das placas de Petri contendo as colônias (mesmo que semelhantes), foi feito o registro de um código para cada morfotipo. Essas informações foram dispostas em uma tabela conforme as coletas e as usinas de origem. As tabelas de 01 a 04 referem-se à Usina

Santo Antônio (USA), as tabelas de 05 a 08 apresentam dados da Usina São João (USJ) e as tabelas de 09 a 12 correspondem à Usina Agroterenas (AT).

Tabela 01 – Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de folhas, coleta I, Usina Santo Antônio – USA

M*	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
1	US AFC1A2	Amarelo esverdeado/branco	Branco	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
2	US AFC1B2	Branco	Branco amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
3	US AFC1C1	Verde	Esverdeado	Granular	Umbilicata	Sim	Sim
4	US AFC1C1	Branco	Preto centro	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
5	US AFC1C1	Branco	Amarelado	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
6	US AFC1C3	Branco leitoso	Branco leitoso	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
7	US AFC2A1	Branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
8	US AFC2A2	Acinzentado	Branco borda centro preto	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
9	US AFC2B1	Verde/branco	Amarelado	Aveludada	Rugosa	Sim	Sim
10	US AFC2B3	Branco/amarelado	Preto/Verde/Amarelo	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
11	US AFC2C1	Branco/verde	Branco	Granular	Umbilicata	Sim	Não
12	US AFC2C3	Amarelo/verde/branco	Branco amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
13	US AFC3B1	Branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
14	US AFC3C2	Cinza/branco	Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
15	US AFC3C3	Branco	Branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
16	US AFC4B1	Branco	Alaranjado	Algodonosa	Rugosa	Sim	Não
17	US AFC4B3	Verde/branco	Branco	Aveludada	Rugosa	Sim	Sim
18	US AFC4C2	Rosa/branco	Rosado/Alaranjado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Sim
19	US AFC4C3	Branco	Branco/preto	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
20	US AFC5C3	Verde	Esverdeado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
21	US AFC5A3	Branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
22	US AFC5B3	Branco	Preto ao centro/ amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
23	US AFC6A2	Branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
24	US AFC6A3	Cinza/branco	Amarelado/Esverdeado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
25	US AFC6B1	Branco/rosado	Verde/rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
26	US AFC6B2	Rosado	Rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
27	US AFC6B3	Esverdeado	Verde escuro	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
28	US AFC6C1	Branco/esverdeado	Branco/Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
29	US AFC7C1	Branco/rosado	Alaranjado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
30	US AFC7A2	Branco	Marrom	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
31	US AFC7B3	Branco	Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
32	US AFC8A2	Branco	Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
33	US AFC8B1	Branco leitoso	Branco	Glabra	Rugosa	Sim	Não
34	US AFC8B3	Esverdeado/branco	Verde escuro/ Branco	Aveludada	Rugosa	Sim	Sim
35	US AFC8C3	Acinzentado	Branco com centro preto	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
36	US AFC9A1	Branco amarelado	Verde escuro/ Amarelo/branco	Algodonosa	Aveludada	Sim	Sim
38	US AFC9C1	Esverdeado	Branco	Algodonosa	Plana	Não	Não
39	US AFC10A1	Cinza	Preto	Aveludada	Verrucosa	Sim	Não
40	US AFC10B2	Branco	Branco	Algodonosa	Plana	Não	Não

*M= morfotipo

Tabela 02 – Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de raízes, **coleta I**, Usina Santo Antônio – USA

M*	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
1	USARC1A1	Rosado	Alaranjado Centro marrom	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
2	USARC1A2	Leitoso	Leitoso	Glabra	Umbilicata	Não	Não
3	USARC1B1	Rosada	Rosado centro escuro	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
4	USARC1C2	Branco	Branco	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
5	USARC2A1	Esbranquiçada	Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
6	USARC2A2	Lilácea	Branca/roxa	Algodonosa	Rugosa	Sim	Não
7	USARC2B3	Leitoso/verde	Leitoso/verde	Glabra/ Aveludada	Plana	Sim	Não
8	USARC3B2	Leitoso	Leitoso	Glabra	Rugosa	Não	Não
9	USARC3B3	Leitoso	Leitoso/ amarelado	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
10	USARC3C1	Verde	Verde/ Amarelado	Aveludada	Plana	Sim	Não
11	USARC4A2	Leitoso/rosado	Rosado/ Amarelado	Algodonosa	Plana	Sim	Não
12	USARC4B1	Roxo/rosado	Rosado/ Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
13	USARC4B2	Rosado/leitoso	Amarelado/ Laranja	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
14	USARC4A1	Branco/leitoso	Branco	Glabra	Umbilicata	Não	Não
15	USARC5A2	Verde	Amarelado	Aveludada	Plana	Sim	Não
16	USARC5C1	Branco/leitoso	Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
17	USARC5B2	Leitoso/verde	Leitoso/ verde	Glabra/ Aveludada	Plana	Sim	Não
18	USARC6A1	Branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
19	USARC6A2	Roxo/branco	Roxo/ Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
20	USARC6A3	Branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
21	USARC6B1	Amarelo/ verde Branco	Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
22	USARC6B1	Branco	Alaranjado/ Branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
23	USARC6B2	Branco	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
24	USARC6B3	Lilás/branco	Lilás alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
25	USARC6C2	Branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
26	USARC7A2	Branco	Alaranjado/ Branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
27	USARC7A2	Lilás/leitoso	Lilás/leitoso	Glabra	Umbilicata	Sim	Sim
28	USARC7A3	Leitoso/verde	Leitoso/verde	Glabra/ Aveludada	Plana	Sim	Não
29	USARC7B1	Lilás/branco	Lilás alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
30	USARC7B2	Lilás/branco	Alaranjado/ Marrom	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
31	USARC8A1	Branco/roxo	Roxo/branco	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
32	USARC8A3	Cinza/rosado	Branco/marrom Laranja	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
33	USARC8C1	Rosado/leitoso	Leitoso	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
34	USARC8C2	Laranja/leitoso	Laranja	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
35	USARC8C3	Branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
36	USARC9A1	Lilás/leitoso	Rosado/ Alaranjado	Glabra/ Aveludada	Umbilicata	Sim	Sim
37	USARC10B3	Branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Sim
38	USARC10B3	Branco	Branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
39	USARC10C1	Rosado	Rosado/ branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
40	USARC10C2	Branco/laranja	Laranja	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não

*M= morfotipo

Tabela 03 – Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de folhas, **coleta II**, Usina Santo Antônio – USA

M *	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
1	USAFC1A1	Branco/verde	Alaranjado	Algodonosa	Rugosa	Sim	Não
2	USAFC1A2	Branco	Creme	Algodonosa	Plana	Não	Não
3	USAFC1B1	Verde/branco	Creme	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
4	USAFC1C1	Verde/branco	Creme	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
5	USAFC1C2	Branco/verde	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Não	Não
6	USAFC2A	Creme	Alaranjado	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
7	USAFC2C1	Marrom	Roxo marrom	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
8	USAFC2C2	Verde/branco	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
9	USAFC3A1	Branco	Branco	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
10	USAFC3A2	Creme/branco	Creme/branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
11	USAFC3C2	Cinza	Cinza	Algodonosa	Plana	Não	Não
12	USAFC4C1	Branco/verde	Verde/branco Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
13	USAFC4B2	Branco	Esverdeado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
14	USAFC4B1	Branco	Esverdeado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
15	USAFC5A	Branco	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Não	Não
16	USAFC5A2	Rosa/branco	Verde/ Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
17	USAFC5B	Branco	Creme	Algodonosa	Plana	Sim	Não
18	USAFC5C1	Esverdeado	Esverdeado/ Amarelo	Algodonosa	Umbilicata	Não	Não
19	USAFC5C2	Branco	Acinzentado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
20	USAFC6A2	Cinza/branco	Verde/creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
21	USAFC6B	Branco	Creme	Algodonosa	Plana	Não	Não
22	USAFC6C	Branco	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
23	USAFC7A1	Branco	Amarelado	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
24	USAFC7B	Branco	Verde/cinza	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
25	USAFC7C	Branco	Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
26	USAFC8B1	Branco/verde	Branco/verde	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
27	USAFC8B2	Branco/marrom	Verde/marrom	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
28	USAFC8C	Acinzentado	Marrom	Algodonosa	Rugosa	Sim	Não
29	USAFC8C2	Verde/branco	Amarelo	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
30	USAFC9A1	Verde	Creme	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
31	USAFC9A2	Branco	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
32	USAFC9B1	Verde	Creme	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
33	USAFC9B2	Branco	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
34	USAFC9C1	Branco	Creme/ Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
35	USAFC10A1	Amarelado	Amarelo	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
36	USAFC10A2	Rosado	Rosado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
37	USAFC10B1	Rosado	Rosado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
38	USAFC10B2	Verde negro	Verde negro	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
39	USAFC10C	Cinza	Verde	Algodonosa	Plana	Sim	Não

*M= morfotipo

Tabela 04 – Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de raízes, **coleta II**, Usina Santo Antônio – USA

M*	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
1	USARC1A1	Lilás	Rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
2	USARC1A2	Rosado	Alaranjado/ Verde	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
3	USARC1B1	Verde	Verde	Granular	Plana	Sim	Não
4	USARC1B2	Branco	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
5	USARC1C1	Creme	Amarelo	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
6	USARC1C2	Rosado	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
7	USARC2A1	Verde	Verde	Granular	Plana	Sim	Não
8	USARC2A2	Lilás	Roxo	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
9	USARC2C	Branco	Rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
10	USARC3A1	Branco	Rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
11	USARC3A2	Lilás	Rosado/roxo	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
12	USARC3C1	Verde/branco	Verde/branco	Granular	Plana	Sim	Não
13	USARC3C1	Branco	Branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
14	USARC4A	Verde	Verde	Granular	Plana	Sim	Não
15	USARC4B1	Creme	Amarelado	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
16	USARC4C1	Branco	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
17	USARC4C2	Branco	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
18	USARC5A1	Verde/branco	Verde/branco Amarelado	Granular	Plana	Sim	Não
19	USARC5A2	Verde/amarelado	Verde/creme	Granular	Plana	Sim	Não
20	USARC5B1	Rosado	Lilás alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
21	USARC5B2	Creme	Amarelado	Granular	Umbilicata	Sim	Não
22	USARC5C1	Verde/creme	Verde/creme	Granular	Umbilicata	Sim	Não
23	USARC5C2	Verde	Verde/creme	Granular	Umbilicata	Sim	Não
24	USARC6A1	Lilás	Roxo/ Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
25	USARC6A2	Verde	Verde	Granular	Plana	Sim	Não
26	USARC6C2	Verde	Amarelado	Granular	Plana	Sim	Não
27	USARC7A	Alaranjado	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
28	USARC7B2	Branco	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
29	USARC7C	Lilás	Lilás	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
30	USARC8A1	Verde	Verde/creme	Granular	Umbilicata	Sim	Não
31	USARC8A2	Verde	Verde/creme	Granular	Umbilicata	Sim	Não
32	USARC8B1	Verde	Verde	Granular	Plana	Sim	Não
33	USARC8B2	Branco/leitoso	Branco leitoso	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
34	USARC8C2	Verde/branco	Verde/branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
35	USARC9A	Branco	Lilás/Amarelo	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
36	USARC9B1	Branco	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
37	USARC9B2	Lilás	Verde	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
38	USARC9C1	Lilás	Roxo	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
39	USARC9C2	Verde/creme	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
40	USARC10A2	Branco	Lilás	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
41	USARC10B1	Rosado	Alaranjado/lilás	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
42	USARC10B2	Branco	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
43	USARC10C1	Creme/verde	Verde/creme	Granular	Plana	Sim	Não
44	USARC10C2	Verde/Amarelado	Creme/verde	Granular	Plana	Sim	Não

*M= morfotipo

Tabela 05 – Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de folhas, coleta I, Usina São João - USJ

M*	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
1	USJFC1A1	Branco	Branco	Glabra	Verrucosa	Sim	Não
2	USJFC1A2	Branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
3	USJFC1B1	Preto/cinza	Preto/branco	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
4	USJFC1B2	Esverdeado/ branco	Esverdeado	Algodonosa	Plana	Sim	Não
5	USJFC1C2	Branco	Marrom claro	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
6	USJFC1 C2	Branco	Branco	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
7	USJFC2B1	Verde/branco	Amarelo/ Verde	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
8	USJFC3B2	Verde/branco	Preto	Algodonosa	Rugosa	Sim	Não
9	USJFC3A2	Creme	creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
10	USJFC3C2	Branco/verde	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
11	USJFC3C2	Branco	Amarelo/ Branco	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
12	USJFC3C1	Verde	Amarelo	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
13	USJFC4A1	Branco/verde	Verde/rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
14	USJFC4A2	Branco	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
15	USJFC4C1	Branco/verde	Branco/ Esverdeado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
16	USJFC5B1	Branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
17	USJFC5C2	Verde	Preto	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
18	USJFC5C1	Rosado	Rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
19	USJFC6A1	Leitoso/ Amarelado	Amarelado	Glabra	Plana	Sim	Não
20	USJFC6B1	Branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
21	USJFC6C1	Branco/verde	Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
22	USJFC7A1	Branco	Amarelado	Algodonosa	Rugosa	Sim	Não
23	USJFC7B2	Branco/rosado	Branco/rosad o	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
24	USJFC7C1	Verde	Esverdeado	Aveludada	Plana	Sim	Não
25	USJFC8B2	Leitoso	Leitoso amarelado	Glabra	Plana	Sim	Não
26	USJFC8B1	Leitoso	Amarelado	Glabra	Plana	Sim	Não
27	USJFC9A1	Branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
28	USJFC9A2	Branco/verde	Branco/verde	Aveludada	Plana	Sim	Não
29	USJFC9C1	Branco/creme	amarelado	aveludada	Umbilicata	Sim	Não
30	USJFC10A1	Branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
31	USJFC10C2	Branco/verde	Esverdeado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não

*M= morfotipo

Tabela 06 – Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de raízes, **coleta I**, Usina São João - USJ

M*	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
1	USJRC1A1	Branco	Branco/lilás	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
2	USJRC1A2	Branco leitoso	Branco Leitoso	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
3	USJRC1A3	Branco	Rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
4	USJRC1B1	Branco	Branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
5	USJRC1B2	Branco	Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
6	USJRC1C2	Branco	Branco	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
7	USJRC1C2	Acinzentado	Acinzentado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
8	USJRC2A1	Cinza	Preto	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
9	USJRC2B2	Verde	Verde	Granular	Plana	Não	Não
10	USJRC2C1	Branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
11	USJRC2C2	Rosado	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
12	USJRC2C3	Branco	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
13	USJRC3A2	Verde/branco	Verde/Creme	Granular	Plana	Não	Não
14	USJRC3B1	Leitoso	Leitoso	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
15	USJRC3B2	Rosado	Alaranjado	Algodonosa	Plana	Sim	Não
16	USJRC3B2	Leitoso	Leitoso	Glabra	Umbilicata	Não	Não
17	USJRC4A1	Branco	Branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
18	USJRC4A1	Branco	Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
19	USJRC4A1	Preto/cinza	Preto/cinza	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
20	USJRC4B1	Branco	Rosado/Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
21	USJRC4B2	Branco	Roxo/lilás	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
22	USJRC4B3	Amarelo/roxo	Amarelo/roxo	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
22	USJRC4B3	Rosado	Rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
23	USJRC4C1	Branco	Branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
24	USJRC5A1	Verde/branco	Verde/branco	Granular	Umbilicata	Sim	Não
25	USJRC5A3	Verde/branco	Verde/amarelo	Algodonosa	Plana	Não	Não
26	USJRC5B1	Leitoso amarelado	Amarelado	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
27	USJRC5C1	Verde	Verde	Granular	Umbilicata	Sim	Não
28	USJRC6A2	Verde	Verde	Granular	Plana	Não	Não
29	USJRC6B1	Leitoso	Leitoso	Glabra	Plana	Não	Não
30	USJRC6B2	Branco	Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
31	USJRC6B3	Branco	Lilás	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
32	USJRC6C1	Branco	Branco/roxo/Lilás	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
33	USJRC6C2	Alaranjado	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Não	Não
34	USJRC6C2	Laranja	Laranja	Glabra	Plana	Não	Não
35	USJRC7B2	Branco	Branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
36	USJRC7B3	Cinza/rosado	Cinza/Alaranjado/Preto	Algodonosa	Plana	Sim	Não
37	USJRC7C2	Verde/branco	Verde/Alaranjado	Algodonosa ao centro	Umbilicata	Não	Não
38	USJRC7C3	Leitoso/Amarelado	Leitoso/Amarelado	Glabra	Plana	Sim	Não
39	USJRC7C3	Rosado	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Não	Não
40	USJRC7C3	Acinzentado	Amarelado	Glabra/Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
41	USJRC8A1	Branco	Rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
42	USJRC8A2	Branco	Rosado/lilás	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
43	USJRC8A3	Verde	Verde	Granular	Plana	Não	Não
44	USJRC8C2	Branco	Branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
45	USJRC9A2	Rosado	Verde/Amarelado/Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
46	USJRC9B1	Leitoso/Amarelado/Rosado	Leitoso/Amarelado/Alaranjado	Glabra/Algodonosa	Umbilicata	Não	Não
47	USJRC9C1	Verde	Verde	Granular	Plana	Não	Não
48	USJRC10A1	Verde	Verde/Amarelado	Aveludada	Plana	Sim	Não
49	USJRC10B2	Branco	Rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
50	USJRC10B3	Acinzentada	Branco/verde	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim

*M= morfotipo

Tabela 07 – Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de folhas, **coleta II**, Usina São João - USJ

M*	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
1	USJFC1A	Branco	Verde creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
2	USJFC1C	Verde	Verde/branco	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
3	USJFC2A1	Creme	Creme	Glabra	Rugosa	Sim	Não
4	USJFC2A2	Verde/branco	Verde/branco	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
5	USJFC2B1	Branco	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
6	USJFC2B2	Verde	Verde/branco	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
7	USJFC2C1	Verde/laranja	Verde/laranja	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
8	USJFC2C2	Verde	Negro	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
9	USJFC3B2	Branco	Creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
10	USJFC3C	Verde/branco	Verde/branco	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
11	USJFC4A1	Creme/branco	Alaranjado	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
12	USJFC4A2	Verde	Negro	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
13	USJFC4C1	Verde/branco	Creme	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
14	USJFC4C2	Verde/branco	Verde/creme	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
15	USJFC5A	Creme	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
16	USJFC5B1	Rosado	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
17	USJFC5B2	Branco	Creme/verde	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
18	USJFC5C	Branco	Creme	Glabra	Rugosa	Sim	Não
19	USJFC6A1	Cinza	Creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Sim
20	USJFC6A1	Rosado	Rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
21	USJFC6A2	Branco	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
22	USJFC6B1	Esverdeado	Esverdeado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
23	USJFC6B2	Acinzentado	Verde	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
24	USJFC6C1	Verde/branco Laranja	Creme/verde	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
25	USJFC6C2	Branco	Creme	Glabra	Verrucosa	Sim	Não
26	USJFC6A	Verde/branco	Amarelado	Aveludada	Verrucosa	Sim	Não
27	USJFC7B	Branco	Branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
28	USJFC7C1	Verde/branco	Marrom	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
29	USJFC7C2	Branco	Branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
30	USJFC8A	Verde	Verde/branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
31	USJFC8B	Branco	Branco/verde	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
32	USJFC9A1	Branco	Creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
33	USJFC9A2	Creme	Creme	Algodonosa	Plana	Não	Não
34	USJFC9B1	Branco	Creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
35	USJFC9B2	Rosado	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
36	USJFC9B3	Branco	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
37	USJFC9C1	Branco	Branco/creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
38	USJFC9C2	Branco	Creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
39	USJFC10B	Branco	Branco/verde	Algodonosa	Umbilicata	Não	Não

*M= morfotipo

Tabela 08 – Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de raízes, **coleta II**, Usina São João - USJ

M*	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
1	USJRC1A1	Rosado	Lilás	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
2	USJRC1A2	Verde	Verde	Granular	Plana	Sim	Sim
3	USJRC1B	Lilás	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
4	USJRC1C	Branco rosado	Amarelado/Rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
5	USJRC2A1	Branco	Rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
6	USJRC2A2	Branco	Rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
7	USJRC2B1	Branco	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
8	USJRC2B2	Rosado	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
9	USJRC2C	Verde	Verde	Granular	Plana	Sim	Não
10	USJRC2B1	Lilás	Branco/creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
11	USJRC3C1	Branco	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
12	USJRC3C2	Verde	Verde	Granular	Umbilicata	Sim	Sim
13	USJRC4A	Verde/branco	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Não	Não
14	USJRC4B1	Verde	Verde	Granular	Plana	Sim	Não
15	USJRC4B2	Verde/branco	Branco/verde	Granular	Umbilicata	Não	Não
16	USJRC5A1	Lilás	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
17	USJRC5A2	Lilás	Lilás	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
18	USJRC5B	Verde/Amarelado	Verde	Granular	Plana	Não	Não
19	USJRC5C	Amarelo/Rosado	Amarelo/Vermelho	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
20	USJRC6A	Verde	Verde	Granular	Plana	Sim	Não
21	USJRC6B2	Rosado	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
22	USJRC7A1	Verde	Verde	Granular	Plana	Sim	Não
23	USJRC7A2	Verde/Amarelo	Verde/Amarelo	Granular	Plana	Não	Não
24	USJRC7B	Branco	Creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
25	USJRC7C1	Branco	Creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
26	USJRC7C2	Verde/Alaranjado	Esverdeado	Aveludada	Umbilicata	Não	Não
27	USJRC7C3	Verde	Verde/creme	Granular	Plana	Não	Não
28	USJRC8B1	Lilás	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
29	USJRC8B2	Lilás	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
30	USJRC8C	Branco/lilás	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
31	USJRC9A1	Verde	Verde	Granular	Plana	Sim	Não
32	USJRC9A2	Verde/Amarelado	Verde/Creme	Granular	Plana	Não	Sim
33	USJRC9B1	Verde/Amarelado	Verde/Creme	Granular	Plana	Não	Sim
34	USJRC9B2	Branco	Creme	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
35	USJRC9C	Branco/creme	Amarelado Verde	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
36	USJRC10A1	Lilás	Branco/cinza	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
37	USJRC10A2	Verde	Verde	Granular	Plana	Sim	Não
38	USJRC10B1	Lilás/verde	Laranja/verde	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
39	USJRC10B2	Lilás/verde	Laranja/verde	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
40	USJRC10C1	Creme	Amarelo	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
41	USJRC10C2	Lilás	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
42	USJRC10C3	Laranja/verde	Laranja/verde	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não

*M= morfotipo

Tabela 09 – Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de folhas, **coleta I**, Agroterenas - AT

M*	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
1	ATFC1A1	Rosado	Rosado Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
2	ATFC1A2	Branco/cinza	Preto/branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
3	ATFC1C1	Branco	Branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
4	ATFC2A1	Esbranquiçado	Branco/Esverdeado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
5	ATFC2C1	Branco/rosado	Rosado/Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
6	ATFC2C2	Branco	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
7	ATFC2C3	Acinzentado	Marrom/verde Rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
8	ATFC3B1	Branco/preto	Branco/preto	Algodonosa	Plana	Não	Não
9	ATFC4A1	Branco/cinza	Creme/Esverdeado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
10	ATFC4B1	Branco/cinza	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
11	ATFC5A1	Branco/preto	Branco/preto	Algodonosa	Plana	Não	Não
12	ATFC5B1	Branco/Esverdeado	Esverdeado/Creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
13	ATFC5C2	Leitoso	Leitoso	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
14	ATFC6A1	Cinza	Preto	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
15	ATFC6A2	Branco esverdeado	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
16	ATFC6C1	Leitoso	Leitoso	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
17	ATFC7A1	Branco/preto	Branco/preto	Algodonosa	Plana	Não	Não
18	ATFC7A2	Branco	Branco	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
19	ATFC7B1	Leitoso Amarelado	Amarelado	Glabra	Plana	Não	Não
20	ATFC7B2	Esbranquiçado	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
21	ATFC7C1	Laranja leitoso	Laranja	Glabra	Plana	Não	Não
22	ATFC7C2	Esbranquiçado	Branco/Esverdeado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
23	ATFC8A1	Rosado	Rosado	Glabra	Rugosa	Sim	Não
24	ATFC8A2	Branco/Esverdeado	Esverdeado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
25	ATFC8B1	Branco	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
26	ATFC8C2	Esverdeado/Branco	Preto	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
27	ATFC9B2	Esverdeado	Preto/Esverdeado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
28	ATFC10A1	Laranja	Laranja	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
29	ATFC10B2	Esbranquiçado	Esverdeado/Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
30	ATFC10C1	Branco/preto	Branco/preto	Algodonosa	Plana	Não	Não

*M= morfotipo

Tabela 10 – Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de raízes, coleta I, Agrotrenas - AT

M*	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
1	ATRC1A1	Rosado	Lilás	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
2	ATRC1A2	Verde Amarelado	Verde Amarelado	Granular	Plana	Sim	Não
3	ATRC1A3	Preto	Preto	Granular	Plana	Sim	Não
4	ATRC1B1	Branco	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
5	ATRC1B3	Lilás	Laranja	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
6	ATRC1C2	Amarelado	Amarelo	Granular	Plana	Não	Não
7	ATRC2A1	Branco	Branco	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
8	ATRC2A3	Cinza	Preto	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
9	ATRC2C2	Verde	Verde	Granular	Plana	Não	Não
10	ATRC2B2	Branco/roxo/verde	Roxo/Alaranjado/verde	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
11	ATRC2B3	Verde/laranja Branco	Laranja/creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
12	ATRC2C1	Laranja/amarelo Verde	Laranja/verde Amarelado	Rugosa	Umbilicata	Sim	Não
13	ATRC2C2	Verde/Amarelado	Verde/Amarelado	Granular	Plana	Sim	Não
14	ATRC2C3	Verde	Verde	Granular	Plana	Não	Não
15	ATRC3B2	Creme	Creme/roxo	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
16	ATRC3B1	Verde	Verde	Granular	Plana	Não	Não
17	ATRC3A2	Verde/laranja	Verde/branco laranja	Granular	Plana	Sim	Não
18	ATRC3C1	Rosado	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
19	ATRC4A1	Alaranjado	Alaranjado	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
20	ATRC4A2	Verde/amarelado	Verde/Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
21	ATRC4A3	Lilás	Lilás/roxo	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
22	ATRC4C1	Leitoso	Leitoso amarelado	Glabra	Plana	Sim	Não
23	ATRC4C2	Verde amarelado	Verde/branco Amarelado	Granular	Umbilicata	Não	Não
24	ATRC5A2	Branco/cinza	Branco/preto	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
25	ATRC5C2	Laranja	Laranja	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Sim
26	ATRC5C1	Verde/branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
27	ATRC6A2	Leitoso	Esverdeado/creme	Glabra	Umbilicata	Não	Não
28	ATRC6A3	Leitoso esverdeado	Leitoso esverdeado	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
29	ATRC6A3	Branco/laranja	Laranja	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
30	ATRC6B1	Leitoso	Leitoso	Glabra	Rugosa	Não	Não
31	ATRC7B1	Verde	Verde amarelado	Granular	Plana	Não	Não
32	ATRC8A1	Branco	Branco	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
33	ATRC8A2	Verde/laranja	Verde/laranja	Granular	Umbilicata	Sim	Não
34	ATRC8A3	Verde	Verde amarelado	Granular	Plana	Não	Não
35	ATRC8B1	Lilás	Roxo/branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
36	ATRC8C2	Leitoso	Leitoso/branco	Glabra	Umbilicata	Não	Não
37	ATRC9A1	Esbranquiçado	Alaranjado/roxo	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
38	ATRC9B1	Alaranjado	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
39	ATRC9B2	Preto	Creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
40	ATRC10A1	Verde	Verde amarelado	Granular	Plana	Não	Não
41	ATRC10A2	Branco	Branco	Glabra	Verrucosa	Sim	Não
42	ATRC10B1	Rosado/lilás	Rosado/Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
43	ATRC10B3	Branco	Branco/Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
44	ATRC10C1	Amarelo/branco	Amarelado	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
45	ATRC10C2	Branco	Branco	Aveludada	Rugosa	Sim	Não

*M= morfotipo

Tabela 11 – Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de folhas, coleta II, Agroterenas - AT

M*	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
1	ATFC1B1	Lilás	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
2	ATFC1B2	Acinzentado	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
3	ATFC1C1	Lilás	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
4	ATFC1C2	Lilás	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
5	ATFC2A1	Lilás	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
6	ATFC2A2	Lilás	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
7	ATFC2B1	Verde/branco	Verde/branco	Granular	Plana	Sim	Não
8	ATFC2B2	Cinza/ Alaranjado	Verde/ Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
9	ATFC2B1	Lilás	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
10	ATFC3A1	Acinzentado	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
11	ATFC3A2	Verde	Verde	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
12	ATFC3B1	Lilás	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
13	ATFC3B2	Acinzentado	Preto	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
14	ATFC3C1	Branco	Branco	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
15	ATFC3C2	Branco	Branco	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
16	ATFC4A1	Lilás	Rosado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
17	ATFC4B1	Branco	Branco/rosado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
18	ATFC4B2	Rosado	Rosado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
19	ATFC4C	Acinzentado	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
20	ATFC5A1	Rosado	Rosado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
21	ATFC5A2	Creme	Creme	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
22	ATFC5B	Verde/branco	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
23	ATFC5C1	Branco/vermelho	Alaranjado/ Vermelho	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
24	ATFC5C2	Lilás	Creme/verde	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
25	ATFC6A1	Lilás	Rosado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Sim
26	ATFC6A2	Branco/cinza	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
27	ATFC6B1	Branco/laranja	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
28	ATFC6B2	Verde/cinza	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
29	ATFC6C1	Branco	Creme	Algodonosa	Rugosa	Sim	Não
30	ATFC6C2	Lilás	Rosado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Sim
31	ATFC7A1	Branco/cinza	Creme/ Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
32	ATFC7A2	Rosado	Rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não

*M= morfotipo

Tabela 12 – Classificação macroscópica dos fungos endofíticos isolados de amostras de raízes, coleta II, Agroterenas - AT

M*	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
1	ATRC1A1	Laranja	Laranja	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
2	ATRC1A2	Verde/ Amarelado	Verde/ Amarelado	Granular	Plana	Não	Não
3	ATRC1B	Verde	Verde	Granular	Plana	Não	Não
4	ATRC1C1	Branco	Branco/lilás	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
5	ATRC1C2	Rosado	Roxo	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
6	ATRC2A1	Verde	Verde	Granular	Plana	Sim	Sim
7	ATRC2A2	Verde/branco	Branco/creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
8	ATRC2C1	Lilás	Creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
9	ATRC2C2	Alaranjado	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
10	ATRC2C	Verde/branco	Branco	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
11	ATRC3A	Verde/amarelo	Verde/amarelo	Granular	Umbilicata	Não	Não
12	ATRC3B	Verde	Verde	Granular	Rugosa	Sim	Não
13	ATRC3C	Verde/branco	Verde/creme	Granular	Umbilicata	Não	Não
14	ATRC4A1	Verde/branco Laranja	Verde/creme Laranja	Granular	Umbilicata	Não	Não
15	ATRC4A2	Verde	Verde	Granular	Umbilicata	Não	Não
16	ATRC4B1	Branco/verde	creme	Algodonosa	Umbilicata	Não	Não
17	ATRC4B2	Branco/verde	Verde/branco	Granular	Umbilicata	Não	Não
18	ATRC4C1	Verde/branco	Laranja/verde	Granular	Umbilicata	Não	Não
19	ATRC4C2	Verde	Verde	Granular	Plana	Não	Não
20	ATRC5A	Branco	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
21	ATRC5B1	Verde/branco	Amarelado	Granular	Umbilicata	Não	Não
22	ATRC5B2	Verde	Verde/ Amarelado	Granular	Plana	Não	Não
23	ATRC5C1	Verde	Creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
24	ATRC5C2	Verde	Verde	Granular	Plana	Não	Não
25	ATRC5C2	Verde	Verde	Granular	Plana	Sim	Não
26	ATRC6A1	Verde/amarelo	Verde/amarelo	granular	Umbilicata	Sim	Não
27	ATRC6A2	Verde/branco	Verde/branco	granular	Plana	Não	Não
28	ATRC6C2	Verde	Verde	Granular	Plana	Sim	Não
29	ATRC6C1	Branco/verde	Verde/amarelo	Granular	Plana	Não	Não
30	ATRC7A	Lilás	Creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
31	ATRC7B1	Rosado	Alaranjado/roxo	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
32	ATRC7B2	Branco	Branco/cinza	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
33	ATRC7C1	Branco	Creme	Granular	Plana	Sim	Não
34	ATRC7C2	Branco	Creme	Granular	Plana	Não	Não
35	ATRC8A2	Verde	Verde	Granular	Plana	Não	Não
36	ATRC8B1	Alaranjado	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
37	ATRC8B2	Verde	Verde	Granular	Plana	Não	Não
38	ATRC8C8	Lilás	Roxo/alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
39	ATRC8C2	Verde	Verde	Granular	Umbilicata	Não	Não
40	ATRC9A1	Verde	Verde	Granular	Plana	Não	Não
41	ATRC9A1	Verde	Verde	Granular	Plana	Não	Não
42	ATRC9B2	Branco	Branco	Glabra	Rugosa	Sim	Não
43	ATRC9B3	Verde	Amarelado	Granular	Rugosa	Sim	Não
44	ATRC9C1	Verde	Verde	Granular	Plana	Não	Não
45	ATRC9C2	Verde	Verde	Granular	Plana	Não	Não
46	ATRC10A	Verde/creme	Verde/creme	Granular	Plana	Não	Não
47	ATRC10B1	Rosado	Avermelhado	Algodonosa	Rugosa	Sim	Não
48	ATRC10C	Branco/verde	Creme/ Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Não	Não

*M= morfotipo

8.2 Fungos edáficos

Após todo o processo de expressão e repicagem dos fungos, foi realizada a avaliação morfológica, com os registros dos morfotipos seguindo o mesmo padrão aplicado aos endofíticos para a formatação das tabelas, sendo: tabelas 13 e 14 para a Usina Santo Antônio (USA), tabelas 15 e 16 para a Usina São João (USJ) e tabelas 17 e 18 para a Usina Agroterenas (AT).

Tabela 13 – Classificação macroscópica dos fungos edáficos isolados de amostras de solo, Usina Santo Antônio – USA, coleta I

M*	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
1	USASC2C1	Branco/lilás	Roxo	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
2	USASC2A3	Branco/verde	Verde/Amarelo	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
3	USASC2C2	Acinzentado	Branco/creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
4	USASC4A1	Branco/lilás	Roxo	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
5	USASC4A2	Verde/branco	Verde/branco Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
6	USASC4A2	Rosado	Rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
7	USASC4A2	Acinzentado	Branco/creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
8	USASC7A1	Leitoso	Leitoso	Glabra	Umbilicata	Não	Não
9	USASC7B1	Branco	Branco/verde	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
10	USASC7C1	Cinza	Verde/creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Sim
11	USASC8A1	Rosado/branco	Branco	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
12	USASC8A2	Cinza amarelado	Amarelado/Branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
13	USASC8A2	Rosado/branco	Branco	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
14	USASC8B1	Branco/creme	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
15	USASC8B2	Branco/cinza	Marrom	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
16	USASC8B3	Branco	Amarelo	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
17	USASC8C1	Laranja	Creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
18	USASC8C2	Branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
19	USASC8C3	Verde	Preto/branco	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
20	USASC9A1	Rosado	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
21	USASC9B1	Acinzentado	Branco/creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
22	USASC9B2	Marrom	Marrom	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
23	USASC9C1	Branco/lilás	Roxo	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
24	USASC9C1	Branco/cinza	Marrom/Alaranjado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
25	USASC9C2	Laranja	Alaranjado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
26	USASC10C1	Esverdeado	Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não

*Morfortipo

Tabela 14 – Classificação macroscópica dos fungos edáficos isolados de amostras de solo, Usina Santo Antônio – USA, coleta II

M*	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
1	USASC2A	Esbranquiçado	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
2	USASC2B	Esverdeado	Verde/creme	Glabra/algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
3	USASC2C	Alaranjado	Branco/ Alaranjado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
4	USASC3A	Roxo/branco	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
5	USASC4A	Branco	Branco	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
6	USASC4B	Alaranjado	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
7	USASC4C	Roxo/branco	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
8	USASC5B2	Verde	Creme	Aveludada	Plana	Sim	Sim
9	USASC5B1	Lilás/branco	Verde/branco /creme	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
10	USASC7C	Branco	Creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
11	USASC8A1	Verde/branco	creme	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
12	USASC8A2	Rosado	Rosado	Aveludada	Plana	Não	Não
13	USASC8B	Creme	Creme/ Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
14	USASC8C	Creme	Creme	Glabra	Plana	Sim	Não
15	USASC9C	Lilás/branco	Creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
16	USASC10A	Branco	Creme	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
17	USASC10C	Branco	Branco	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não

*M = morfotipo

Tabela 15 – Classificação macroscópica dos fungos edáficos isolados de amostras de solo, Usina São João – USJ, coleta I

M*	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
1	USJSC1B1	Verde/branco	Amarelado	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
2	USJSC1B2	Branco	Lilás/roxo	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
3	USJSC1B3	Esverdeado/ Preto	Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
4	USJSC1C1	Verde/branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	sim
5	USJSC2B1	Creme	Amarelado/ Preto	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
6	USJSC2A2	Branco	Branco	Algodonosa	Umbilicata	Não	Não
7	USJSC2A1	Verde/branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	sim
8	USJSC3A1	Lilás/branco	Roxo	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
9	USJSC3A1	Acinzentado	Branco/rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
10	USJSC3B1	Amarelado	Verde/amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Sim
11	USJSC9A1	Verde/branco	Creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
12	USJSC10A1	Alaranjado	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não

*M= morfotipo

Tabela 16 – Classificação macroscópica dos fungos edáficos isolados de amostras de solo, Usina São João – USJ, coleta II

M*	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
1	USJSC1A1	Verde	Verde/creme	Granular	Plana	Sim	Não
2	USJSC1A2	Lilás	Lilás alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
3	USJSC2B	Marrom	Marrom	Glabra	Plana	Sim	Não
4	USJSC2C1	Branco	Creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
5	USJSC2C2	Branco/rosado	Lilás/alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
6	USJSC3B	Verde/branco	Creme	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
7	USJSC4B	Esbranquiçado	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
8	USJSC5B	Alaranjado	Alaranjado	Glabra	Umbilicata	Sim	Não
9	USJSC5C	Lilás/ Alaranjado	Roxo/ Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
10	USJSC7B	Acinzentado	Amarronzado	Glabra	Plana	Sim	Não
11	USJSC7C	Lilás	Branco/ Acinzentado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
12	USJSC10A	Cinza/branco	Cinza/verde	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
13	USJSC10B2	Verde	Creme	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
14	USJSC10B1	Amarelado	Amarelado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não

*M = morfotipo

Tabela 17 – Classificação macroscópica dos fungos edáficos isolados de amostras de solo, Usina Agroterenas – AT, coleta I

M*	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
1	ATSC1C1	Verde/branco	Amarelo	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
2	ATSC2A1	Verde/branco	Amarelo	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
3	ATSC3B1	Verde/branco	Amarelo	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
4	ATSC4A1	Verde/branco	Amarelo	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
5	ATSC5C1	Verde/branco	Amarelo	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
6	ATSC6B1	Verde/branco	Amarelo	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
7	ATSC7A1	Verde/branco	Amarelo	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
8	ATSC8A1	Verde/branco	Amarelo	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
9	ATSC9A1	Verde/branco	Amarelo	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
10	ATSC10A1	Verde/branco	Amarelo	Aveludada	Rugosa	Sim	Não

*M = morfotipo : todas as placas expressaram exatamente o mesmo morfotipo nas três réplicas que, pelas características é o *Penicillium* sp.

Tabela 18 – Classificação macroscópica dos fungos edáficos isolados de amostras de solo, Usina Agroterenas - AT, coleta II

M*	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
1	ATSC2C1	Verde	Verde	Granular	Rugosa	Sim	Não
2	ATSC2C2	Avermelhado	Avermelhado	Algodonosa	Rugosa	Sim	Não
3	ATSC3C1	Cinza/ Alaranjado	Creme/ Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
4	ATSC3C2	Branco/ Alaranjado	Creme/ Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
5	ATSC3C3	Verde	Verde	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
6	ATSC4C	Verde/branco	Creme	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
7	ATSC5C1	Azulado	Creme	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
8	ATSC5C2	Branco	Branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
9	ATSC6C1	Creme	Creme	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
10	ATSC6C2	Creme	Creme	Glabra	Plana	Sim	Não
11	ATSC7C1	Verde/branco	Amarelo/creme	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
12	ATSC7C2	Verde	Amarelado	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
13	ATSC9C2	Branco/alaranjado	Lilás/Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
14	ATSC9C1	Verde/branco	Creme/Amarelado	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
15	ATSC10B	Branco/verde	Creme	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
16	ATSC10C1	Verde	Amarelado	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
17	ATSC10C3	Verde/Amarelado	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não

*M = morfotipo

8.3 Morfotipos

Dos morfotipos descritos para as três usinas (Santo Antônio, São João e Agroterenas) e referentes aos morfotipos dos fungos endofíticos referentes à coleta II, foram feitos alguns registros durante a segunda repicagem (Figuras 19 a 48).

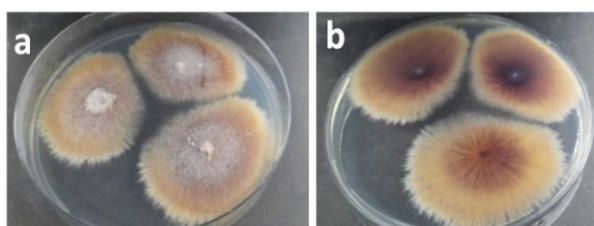


Figura 19 – Colônias do morfotipo USAFC2C1 prospectado da folha, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

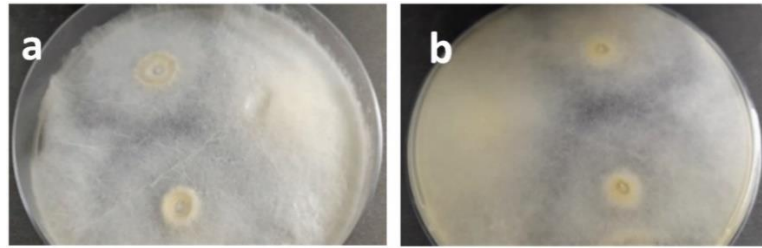


Figura 20 – Colônias do morfotipo USAFC3A2 prospectado da folha, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

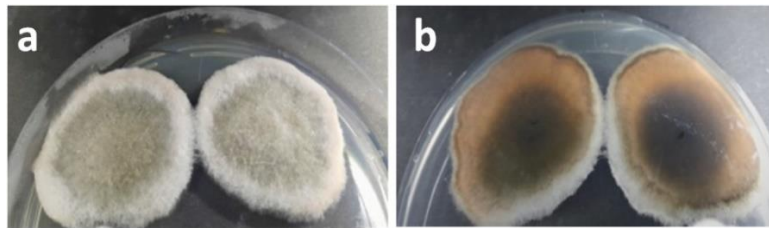


Figura 21 – Colônias do morfotipo USAFC4C1 prospectado da folha, coleta II Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

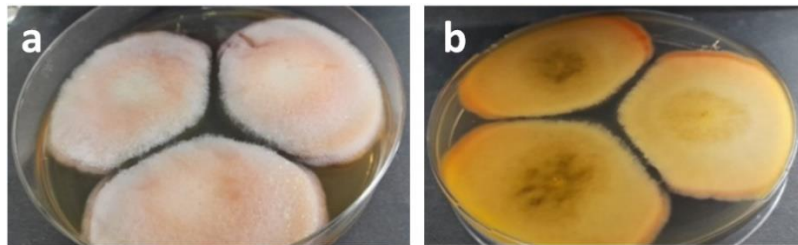


Figura 22 – Colônias do morfotipo USAFC6A2 prospectado da folha, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

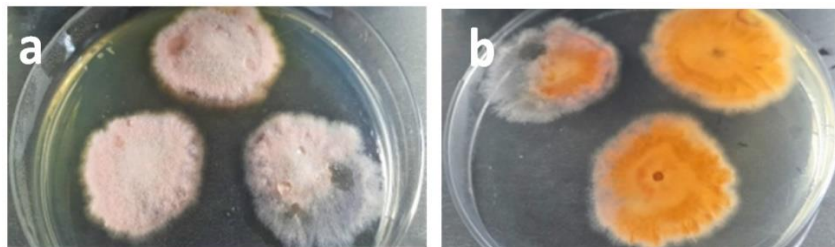


Figura 23 – Colônias do morfotipo USAFC6C prospectado da folha, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

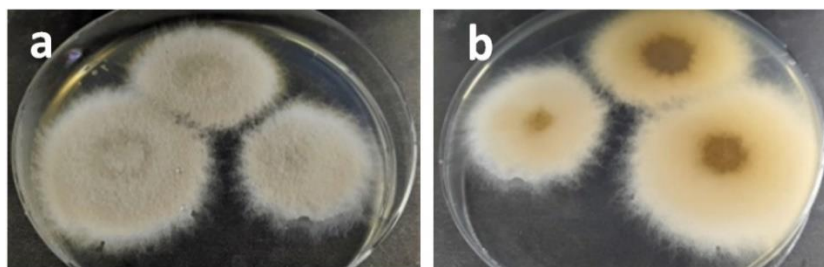


Figura 24 – Colônias do morfotipo USAFC7B prospectado da folha, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

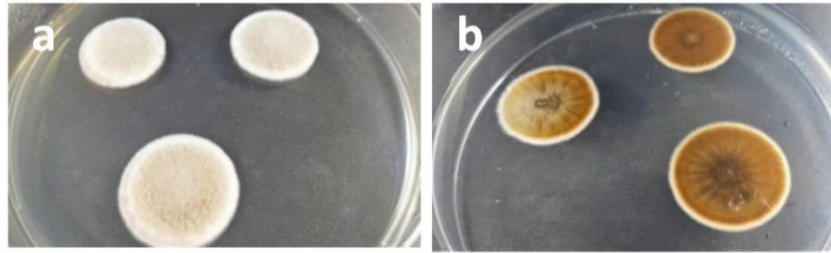


Figura 25 – Colônias do morfotipo USAFC8C prospectado da folha, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

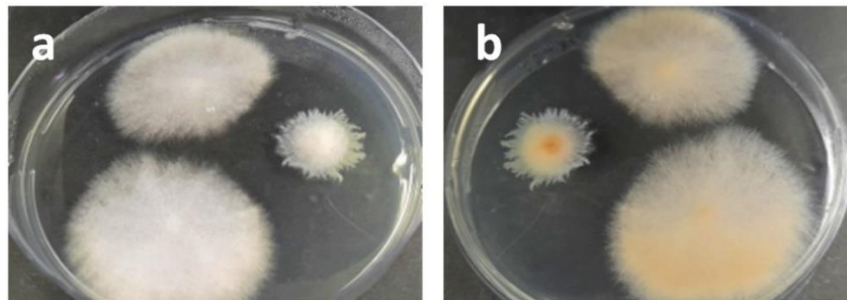


Figura 26 – Colônias do morfotipo USARC1C2 prospectado da raiz, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

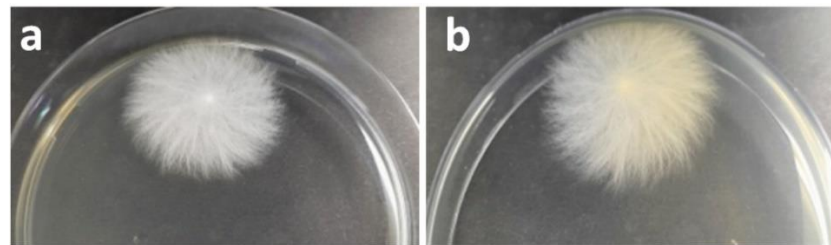


Figura 27 – Colônia do morfotipo USARC4C2 prospectado da raiz, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

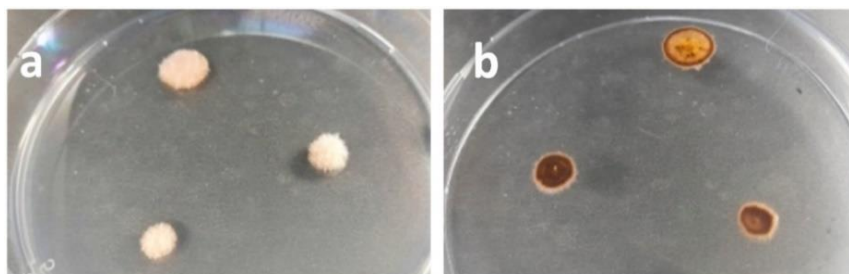


Figura 28 – Colônias do morfotipo USARC4B2 prospectado da raiz, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

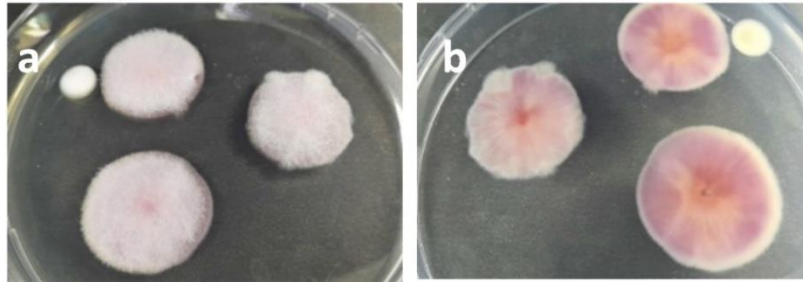


Figura 29 – Colônias do morfotipo USARC9C1 prospectado da raíz, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

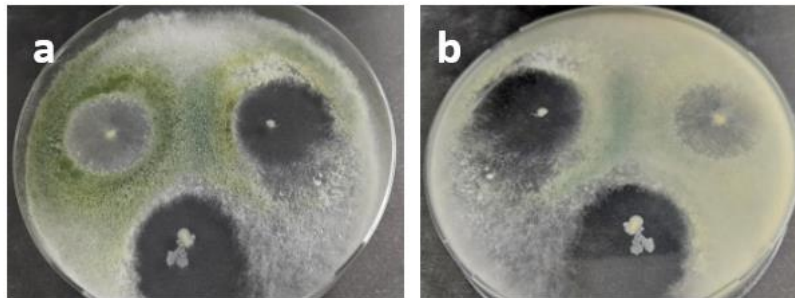


Figura 30 – Colônias do morfotipo USARC10C1 prospectado da raíz, coleta II, Usina Santo Antônio: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

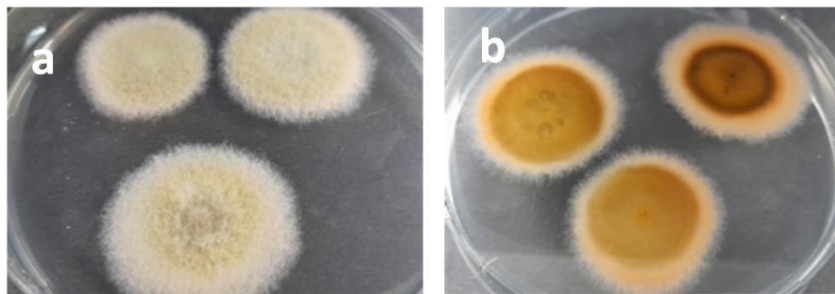


Figura 31 – Colônias do morfotipo USJFC1C prospectado da folha, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

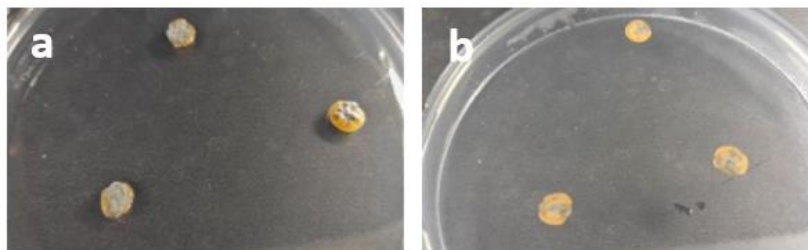


Figura 32 – Colônias do morfotipo USJFC2C1 prospectado da folha, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

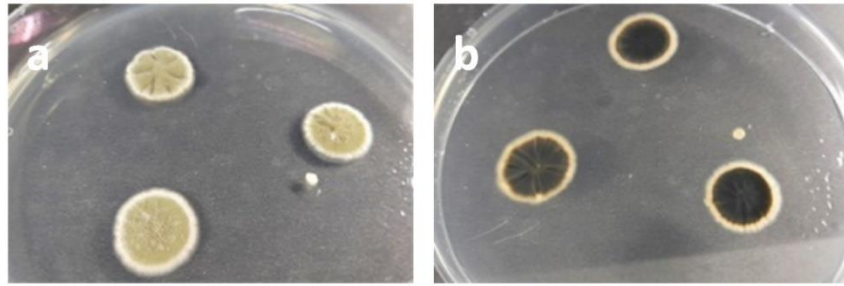


Figura 33 – Colônias do morfotipo USJFC2C2 prospectado da folha, à coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

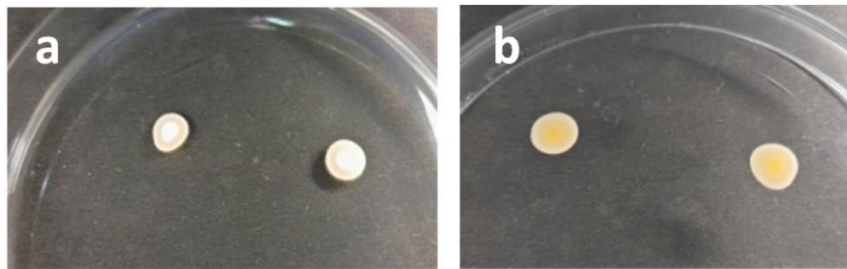


Figura 34 – Colônias do morfotipo USJFC4A1 prospectado da folha, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

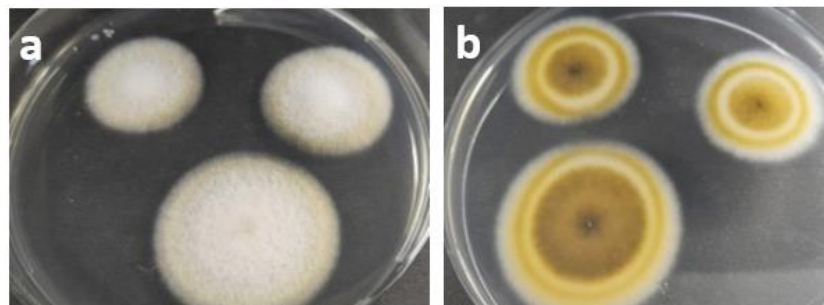


Figura 35 – Colônias do morfotipo USJFC5B2 prospectado da folha, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

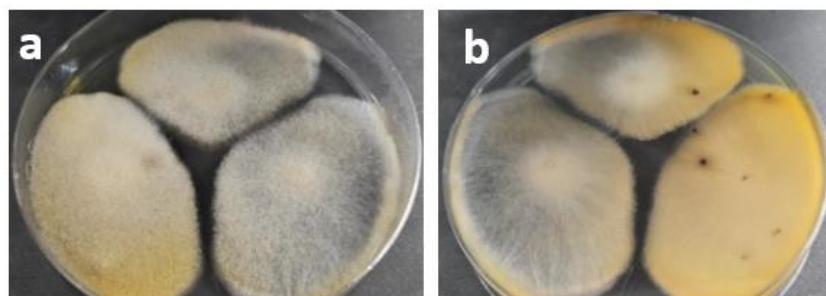


Figura 36 – Colônias do morfotipo USJFC6B1 prospectado da folha, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

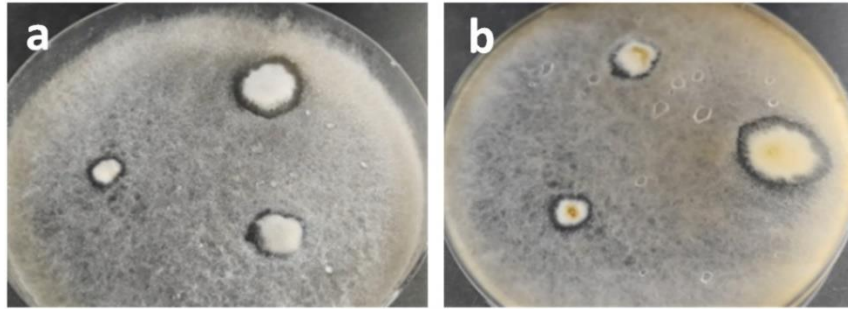


Figura 37 – Colônias do morfotipo USJFC9A1 prospectado da folha, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

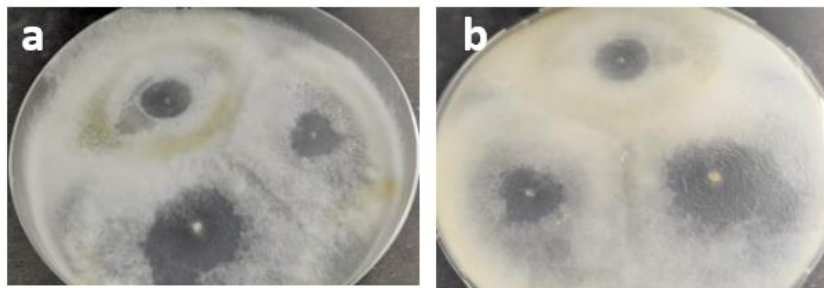


Figura 38 – Colônias do morfotipo USJRC2B1 prospectado da raiz, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

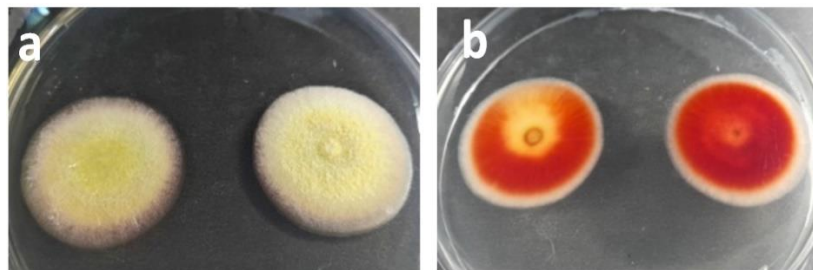


Figura 39 – Colônias do morfotipo USJRC5C prospectado da raiz, coleta II, Usina São João: frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

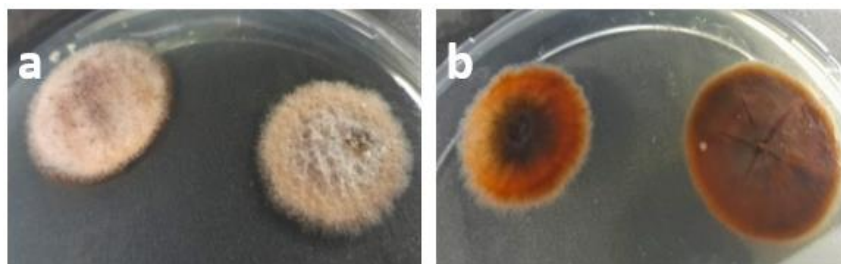


Figura 40 – Colônias do morfotipo USJRC10C3 prospectado da raiz, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

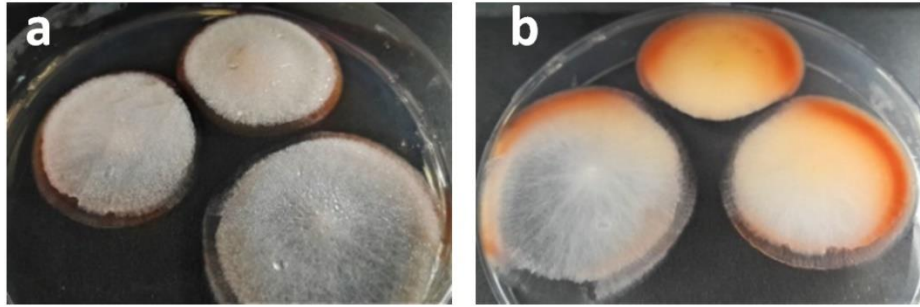


Figura 41 – Colônias do morfotipo ATFC5C1 prospectados da folha, coleta II, Usina Agroterenas: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

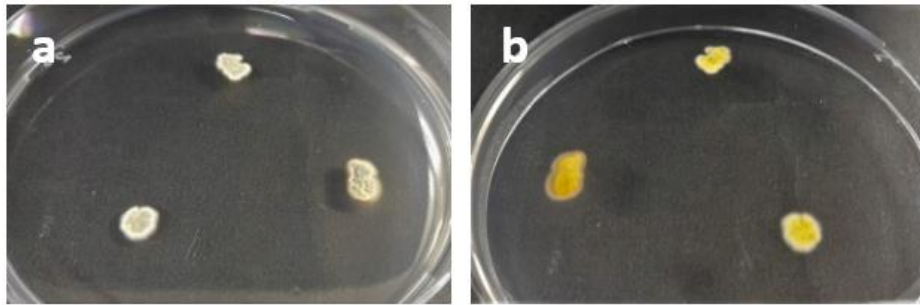


Figura 42 – Colônias do morfotipo ATFC8C2 prospectado da folha, à coleta II, Usina Agroterenas: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

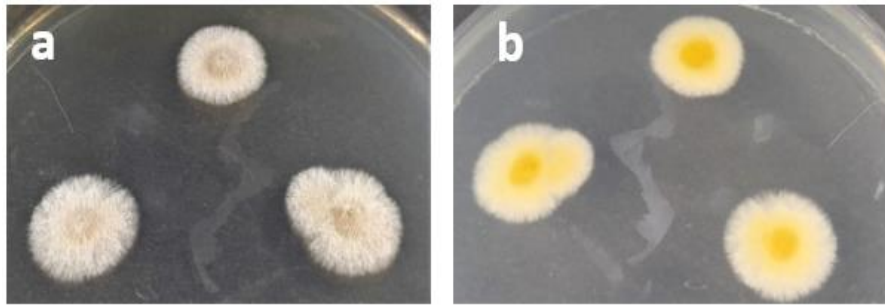


Figura 43 – Colônias do morfotipo ATFC9B2 prospectado da folha, coleta II, Usina Agroterenas: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

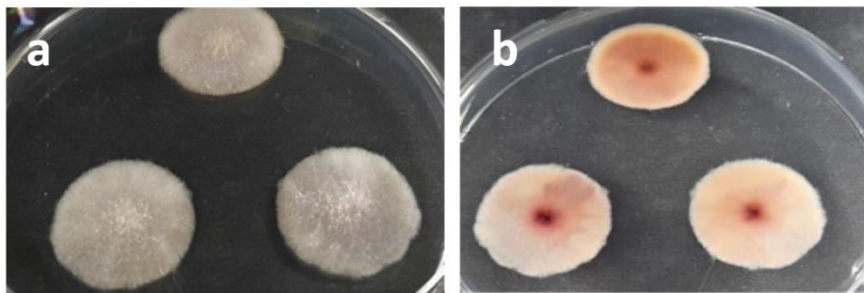


Figura 44 – Colônias do morfotipo ATRC1C2 prospectado da raiz, coleta II, Usina Agroterenas: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

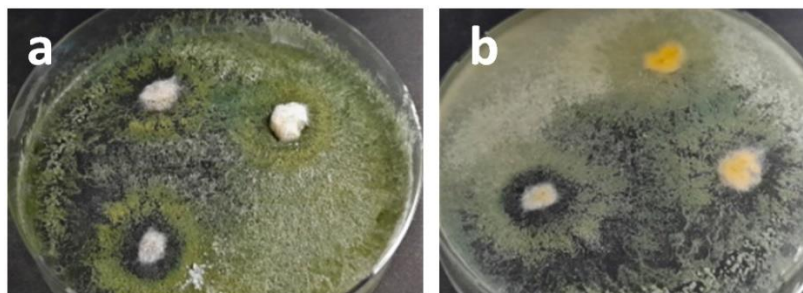


Figura 45 – Colônias do morfotipo ATRC4C1 prospectado da raíz, coleta II, Usina São João: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

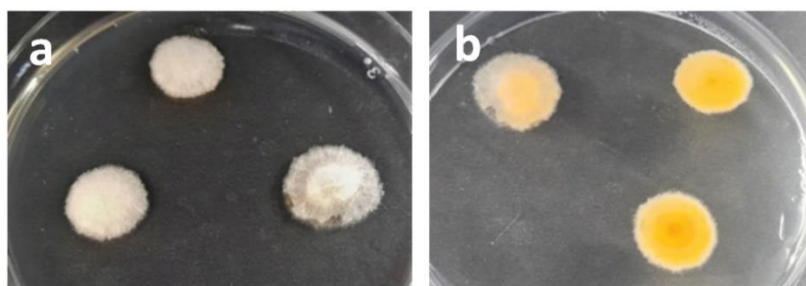


Figura 46 – Colônias do morfotipo ATRC5A prospectado da raíz, coleta II, Usina Agroterenas: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

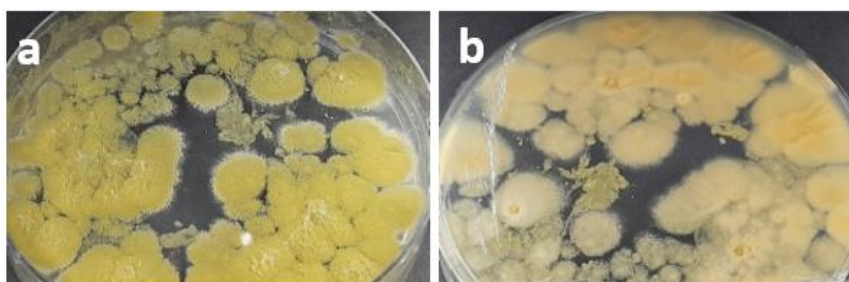


Figura 47 – Colônias do morfotipo ATRC5C1 prospectado da raíz, coleta II, Usina Agroterenas: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

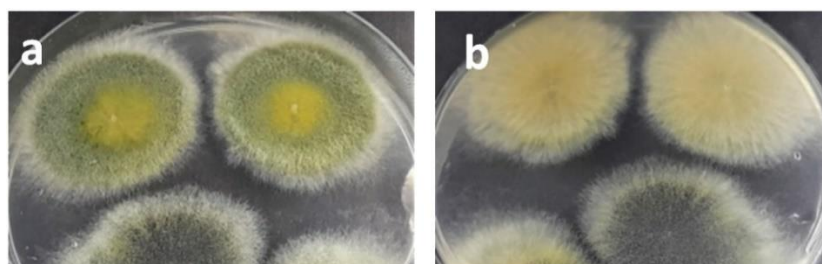


Figura 48 – Colônias do morfotipo ATRC6A1 prospectado da raíz, à coleta II, Usina Agroterenas: a) frente; b) verso. Fonte: Pereira, R.M.C., 2022.

8.4 Avaliação molecular e espécies identificadas

Após as avaliações macroscópicas e verificação das condições de crescimento das colônias, após as repicagens, foi possível encaminhar para a análise molecular 17 morfotipos (Tabela 19).

Tabela 19 – Fungos endofíticos e edáficos da cana-de-açúcar, referentes às coletas I e II, folhas, raízes e solo, enviados para avaliação molecular

Coleta	M*	Código	Cor frente	Cor verso	Textura	Topografia	Crescimento Uniforme	Anéis Concêntricos
I	7	USAFC2A1	Branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
I	11	USAFC2C1	Branco/verde	Branco	Granular	Umbilicata	Sim	Não
I	26	USAFC6B2	Rosado	Rosado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
I	26	USARC7A1	Branco	Alaranjado/ Branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
I	40	USARC10C2	Branco/laranja	Laranja	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
I	20	USJFC6B1	Branco	Amarelado	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
I	29	USJFC9C1	Branco/creme	Amarelado	aveludada	Umbilicata	Sim	Não
II	10	USAFC3A2	Creme/branco	Creme/branco	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
II	21	ATFC5A2	Creme	Creme	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
II	5	ATRC1C2	Rosado	Roxo	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
II	19	ATRC4C2	Verde	Verde/creme	Granular	Plana	Não	Não
II	4	USASC3A	Roxo/branco	Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
II	9	USASC5B1	Lilás/branco	Verde/branco /creme	Aveludada	Rugosa	Sim	Não
II	11	USASC8A1	Verde/branco	Creme	Aveludada	Umbilicata	Sim	Não
II	5	USJSC2C2	Branco/rosado	Lilás/alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não
II	1	ATSC2C1	Verde	Verde	Granular	Umbilicata	Sim	Não
II	4	ATSC3C2	Branco/ Alaranjado	Creme/ Alaranjado	Algodonosa	Umbilicata	Sim	Não

*Morfotipo

Dos 17 morfotipos enviados para análise molecular, foram identificadas sete espécies diferentes, sendo as demais iguais, sendo todas com nível de confiabilidade acima de 98% (Tabela 20).

Tabela 20 – Espécies identificadas após análise molecular dos fungos endofíticos e edáficos da cana-de-açúcar, referentes às coletas I e II, folhas, raízes e solo

Coleta	M*	Código	Bases	Confiabilidade	Espécie confirmada
I	7	USAFC2A1	541/541 bases ITS	100%	<i>Beauveria bassiana</i>
I	11	USAFC2C1	550/550 bases ITS 609/611 bases TEF	99%	<i>Penicillium chrysogenum group</i>
I	26	USAFC6B2	514/514 bases ITS 521/514 bases TEF	100%	<i>Fusarium andiyazi</i>
I	26	USARC7A1	515/515 bases ITS 577/578 bases TEF	99 %	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>species complex (foetens)</i>
I	40	USARC10C2	515/515 bases ITS 563/563 bases TEF	100%	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>species complex (foetens)</i>
I	20	USJFC6B1	541/541 bases ITS	100%	<i>Beauveria bassiana</i>
I	29	USJFC9C1	538/538 bases ITS	100%	<i>Beauveria bassiana</i>
II	10	USAFC3A2	515/515 bases ITS 564/564 bases TEF	100%	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>species complex (foetens)</i>
II	21	ATFC5A2	509/510 bases ITF	99%	<i>Trichosporon asahii</i>
II	5	ATRC1C2	515/515 bases ITS 581/581 bases TEF	100%	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>species complex (foetens)</i>
II	19	ATRC4C2	564/564 bases ITS 597/599 bases TEF	99%	<i>Aspergillus sojae</i>
II	4	USASC3A	515/515 bases ITS 564/564 bases TEF	100%	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>species complex (foetens)</i>
II	9	USASC5B1	512/512 bases ITS	100%	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
II	11	USASC8A1	556/559 bases ITS 571/589 bases TEF	98%	<i>Penicillium chrysogenum group</i>
II	5	USJSC2C2	516/516 bases ITS 5851/581 bases TEF	100%	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>species complex (foetens)</i>
II	1	ATSC2C1	562/563 bases ITS 604/609 bases TEF	99%	<i>Aspergillus sojae</i>
II	4	ATSC3C2	515/514 bases ITS 554/554 bases TEF	100%	<i>Fusarium fujikuroi species complex</i>

*Morfortipo; em negrito espécies diferentes

Placas contendo as colônias dos morfotipos dos fungos endofíticos e edáficos identificados por análise molecular referentes à coleta I (Figuras 49 a 55):



Figura 49 – Fungo endofítico *Beauveria bassiana* prospectado da folha, morfotipo 7 da amostra USAFC2A1, coleta I, Usina Santo Antônio. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024



Figura 50 – Fungo endofítico *Penicillium chrysogenum* group prospectado da folha, morfotipo 11 da amostra USAFC2C1, coleta I, Usina Santo Antônio. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.



Figura 51 – Fungo endofítico *Fusarium andiyazi* prospectado da folha, morfotipo 26 da amostra USAFC6B2, coleta I, Usina Santo Antônio. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.



Figura 52 – Fungo endofítico *Fusarium oxysporum* prospectado da raiz, morfotipo 26 da amostra USARC7A1, coleta I, Usina Santo Antônio. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024



Figura 53 – Fungo endofítico *Fusarium oxysporum* prospectado da raiz, morfotipo 40 da amostra USARC10C2, coleta I, Usina Santo Antônio. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024



Figura 54 – Fungo endofítico *Beauveria bassiana* prospectado da folha, morfotipo 20 da amostra USJFC6B1, coleta I, Usina São João. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024



Figura 55 – Fungo endofítico *Beauveria bassiana* prospectado da folha, morfotipo 29 da amostra USJFC9C1, coleta I, Usina São João. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024

Placas contendo as colônias dos morfotipos dos fungos endofíticos e edáficos identificados por análise molecular referentes à coleta II (Figuras 56 a 64) :



Figura 56 – Fungo endofítico *Fusarium oxysporum* prospectado da folha, morfotipo 10 da amostra USAFC3A2, coleta II, Usina Santo Antônio. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024



Figura 57 – Fungo endófito *Trichosporon asahii* prospectado da folha, morfotipo 21 da amostra ATFC5A2, coleta II, Usina Agrotrenas. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024



Figura 58 – Fungo endófito *Fusarium oxysporum* prospectado da raiz, morfotipo 5 da amostra ATRC1C2, coleta II, Usina Agrotrenas. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024



Figura 59 – Fungo endófito *Aspergillus sojae* prospectado da raiz, morfotipo 19 referente da amostra ATRC4C2, coleta II, Usina Agrotrenas. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024



Figura 60 – Fungo edáfico *Fusarium oxysporum* prospectado do solo, morfotipo 4 da amostra USASC3A, coleta II, Usina Santo Antônio. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024



Figura 61 – Fungo edáfico *Purpureocillium lilacinum* prospectado do solo, morfotipo 9 da amostra USASC5B1, coleta II, Usina Santo Antônio. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024



Figura 62 – Fungo edáfico *Fusarium oxysporum* prospectado do solo, morfotipo 5 da amostra USJSC2C2, coleta II, Usina São João. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024

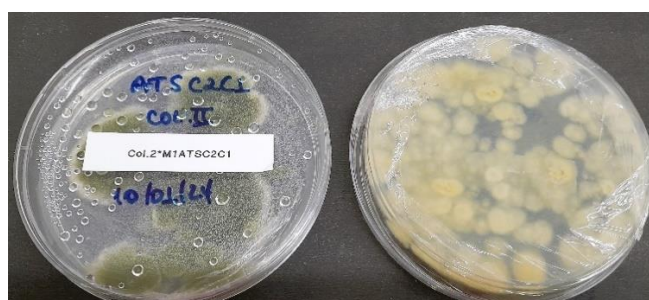


Figura 63 – Fungo edáfico *Aspergillus sojae* prospectado do solo, morfotipo 1 da amostra ATSC2C1, coleta II, Usina Agroterenas. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024

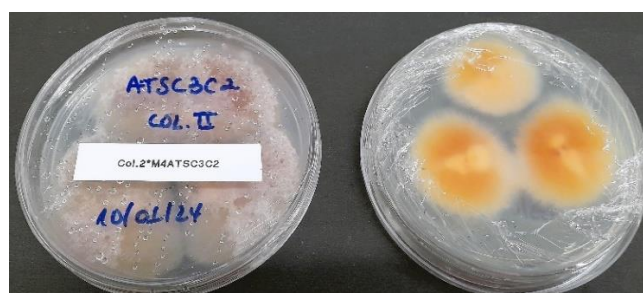


Figura 64 – Fungo edáfico *Fusarium fujikuroi* prospectado do solo, morfotipo 4 da amostra ATSC3C2, coleta II, Usina Agroterenas. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.

8.5 Experimentos de patogenicidade em condições de laboratório

8.5.1 Experimentos em inseto-teste *Galleria mellonella*

Do total de 100 larvas de *G. mellonella*, 23 apresentaram mortalidade e esporulação confirmadas. Os fungos que demonstraram potencial de patogenicidade foram: USAFC2A1 e ATFC7A2, USJFC6B1 e USJFC9C1 referentes à coleta I e USAFC2C1, USARC10C2, e ATRC1C2 referentes à coleta II (Figura 65).

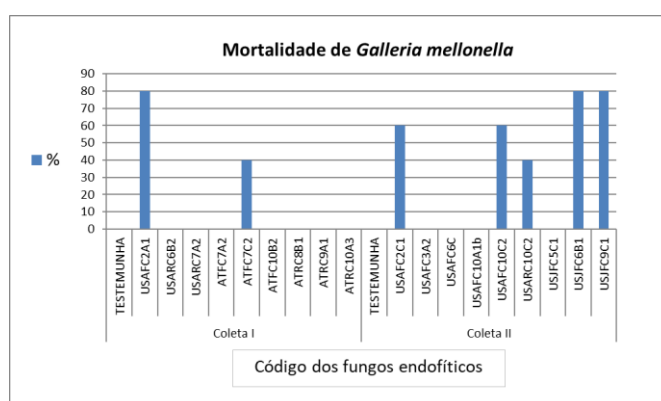


Figura 65 – Porcentagem de mortalidade confirmada em teste de patogenicidade de fungos endofíticos de cana-de-açúcar em *Galleria mellonella*. Fonte: Pereira, R.M.C., 2023.

Após a avaliação da mortalidade confirmada, foram feitos alguns registros do fluxo de avaliação e repicagens das larvas infectadas e esporuladas com os fungos aplicados no teste com *G. mellonella* (Figura 66).



Figura 66 – Parte do experimento com larvas de *Galleria mellonella* x fungos endofíticos coleta I: a) placa da repicagem com colônias do fungo; b) placa com colônias (repicagem 2) para o experimento; c) larvas de *G. mellonella* esporulada; d) placa com colônias do fungo endofítico repicado da larva esporulada. Imagem: Pereira, R.M.C., 2023.

8.5.2 Experimentos com adultos de *S. levis* e fungos endofíticos

No experimento realizado com o fungo endofítico prospectado da folha, morfotipo 20 da amostra USJFC6B1, coleta I, Usina São João, e identificado como *Beauveria bassiana*, os tratamentos T2 e T5 apresentaram maior mortalidade. No entanto, após a verificação estatística, não foi constatada diferença significativa entre eles (Figura 67).

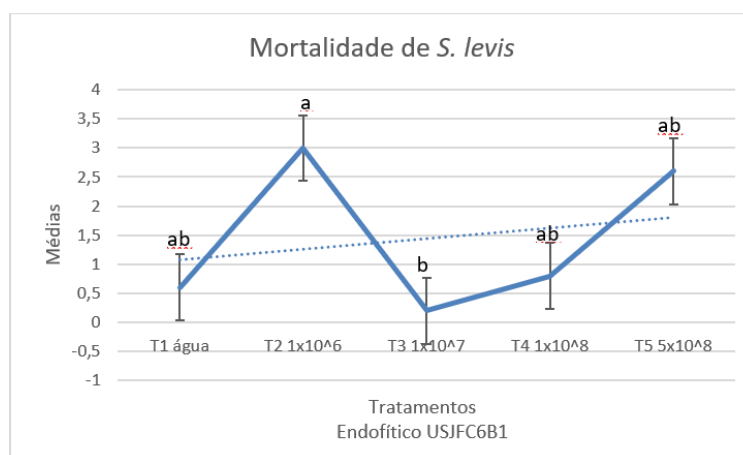


Figura 67 - Médias de mortalidade total de *Sphenophorus levis* após aplicação de suspensão fúngica com diferentes tratamentos do fungo endofítico USJFC6B1 *Beauveria bassiana*. Resultados após o teste Tukey ($p < 0,05$) por meio do software RStudio. Fonte, Pereira, R.M.C., 2024.

No experimento realizado com o fungo endofítico *Trichosporon asahii* prospectado da folha, morfotipo 21 da amostra ATFC5A2, coleta II, Usina Agroterenas, o tratamento T5 com a concentração de 5×10^8 conídios/mL apresentou maior mortalidade e após a verificação estatística, foi constatada diferença significativa em relação aos demais tratamentos (Figura 68).

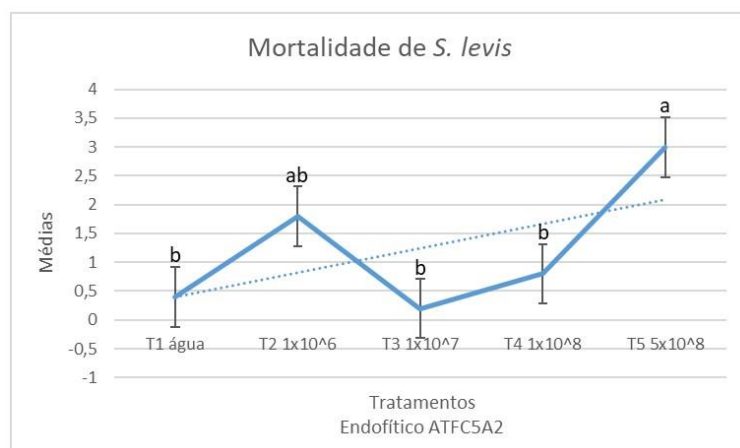


Figura 68 - Médias de mortalidade total de *Sphenophorus levis* após aplicação de suspensão fúngica com diferentes tratamentos do fungo endofítico ATFC5A2 *Trichosporon asahii*. Resultados após o teste Tukey ($p < 0,05$) por meio do software RStudio. Fonte, Pereira, R.M.C., 2024.

No experimento realizado com o fungo endofítico *Fusarium oxysporum* prospectado da raiz, morfotipo 40 da amostra USARC10C2, coleta I, Usina Santo Antônio, o tratamento T2, com a concentração de 1×10^6 conídios/mL, apresentou maior mortalidade. Após a verificação estatística, foi constatada diferença significativa em relação aos demais tratamentos (Figura 69).

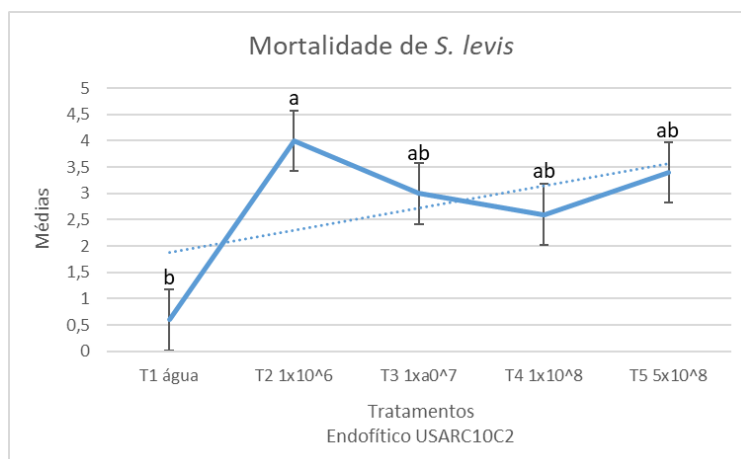


Figura 69 - Médias de mortalidade total de *Sphenophorus levis* após aplicação de suspensão fúngica com diferentes tratamentos do fungo endofítico USARC10C2 *Fusarium oxysporum*. Resultados após o teste Tukey ($p < 0,05$) por meio do software RStudio. Fonte, Pereira, RMC, 2024.

8.5.3 Experimentos com adultos de *S. levis* e fungos edáficos

No experimento realizado com o fungo endofítico *Penicillium chrysogenum* group, morfotipo 11 da coleta II, Usina Santo Antônio, o tratamento T2, com a concentração de 1×10^6 conídios/mL, apresentou maior mortalidade. Após a verificação estatística, foi constatada diferença significativa em relação aos demais tratamentos (Figura 70).

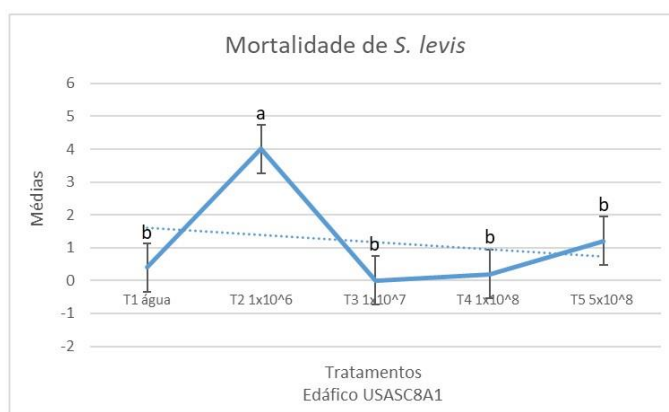


Figura 70 - Médias de mortalidade total de *Sphenophorus levis* após aplicação de suspensão fúngica com diferentes tratamentos do fungo endofítico USASC8A1 *Penicillium chrysogenum* group. Resultados após o teste Tukey ($p < 0,05$) por meio do software RStudio. Fonte, Pereira, RMC, 2024.

No experimento realizado com o fungo endofítico edáfico *Aspergillus sojae*, prospectado do solo, morfotipo 1 da amostra ATSC2C1, coleta II, Usina Agroterenas, o tratamento T5, com a concentração de 5×10^8 conídios/mL, apresentou maior mortalidade. Após a verificação estatística, foi constatada diferença significativa em relação aos demais tratamentos (Figura 71).

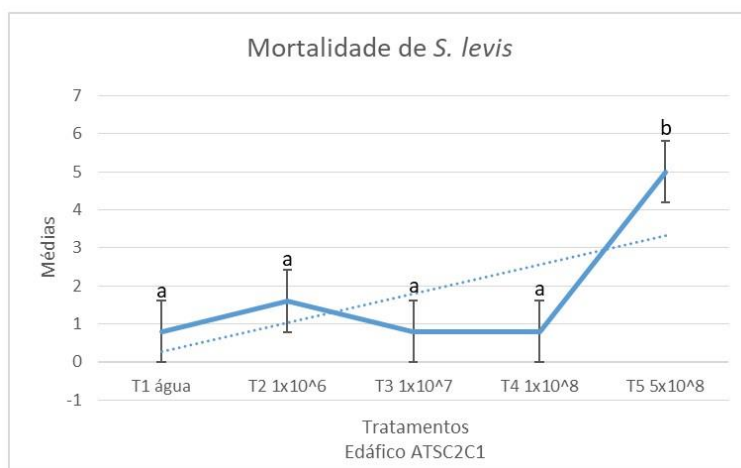


Figura 71 - Médias de mortalidade total de *Sphenophorus levis* após aplicação de suspensão fúngica com diferentes tratamentos do fungo endofítico ATSC2C1 *Aspergillus sojae*. Resultados após o teste Tukey ($p < 0,05$) por meio do software RStudio. Fonte, Pereira, RMC, 2024.

Para o experimento com o fungo ATSC2C1, houve esporulação nas carcaças infectadas, o que foi confirmado pela observação em lâmina (Figura 72).

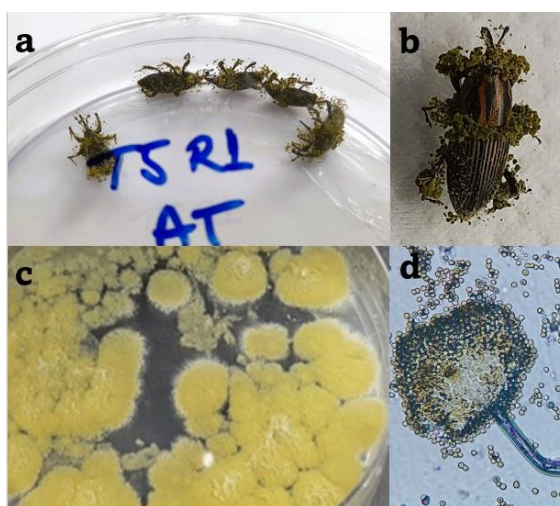


Figura 72 – Etapas de confirmação de mortalidade de *Sphenophorus levis* após aplicação do fungo edáfico ATSC2C1 *Aspergillus sojae*: a) placa da avaliação da mortalidade com insetos esporulados após 7 dias em câmara úmida; b) *Sphenophorus levis* infectado e esporulado; c) Placa de Petri com colônias do fungo repicado da carcaça do inseto; d) lâmina com conidióforo e conídios do fungo edáfico sob microscópio óptico em 400x. Imagem: Pereira, RMCP, 2024.

Para verificar novamente se haveria confirmação da mortalidade, repetiu-se o experimento nas mesmas condições com o fungo edáfico *Aspergillus sojae* prospectado do solo, morfotipo 1 da amostra ATSC2C1, coleta II, Usina Agroterenas. Os tratamentos T2, com a concentração de 1×10^6 conídios/mL, e T5, com a concentração de 5×10^8 conídios/mL, apresentaram as maiores médias de mortalidade após a verificação estatística. No entanto, não foi constatada diferença significativa em relação aos demais tratamentos (Figura 73).

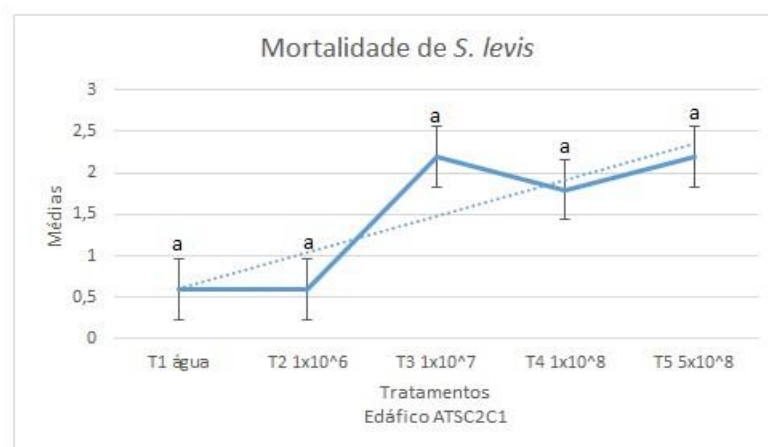


Figura 73 - Médias de mortalidade total de *Sphenophorus levis* após aplicação de suspensão fúngica com diferentes tratamentos do fungo endofítico ATSC2C1 *Aspergillus sojae*. Resultados após o teste Tukey ($p < 0,05$) por meio do software RStudio. Fonte, Pereira, RMC, 2024.

9. DISCUSSÃO

9.1 Prospecção dos fungos endofíticos

Embora o trabalho de prospecção de fungos endofíticos tenha alcançado 480 isolados, muitos foram perdidos durante as repicagens devido às suas características fastidiosas. Foi constatado que o maior número de isolados provinha das amostras das folhas, seguidas pelas amostras das raízes, e, por fim, pelos isolados obtidos do solo. Isso sugere que pode haver similaridade nas condições gerais de manipulação do solo e manutenção das lavouras (Zhao et al., 2016; Huang et al., 2020).

A diversidade e abundância de fungos endofíticos podem variar conforme o tecido analisado, devido a diversos fatores, como as características bióticas e abióticas do ambiente e da microbiota associada a cada microbioma. As folhas, por estarem expostas ao ambiente externo, incluindo condições como chuva, vento e radiação solar, são mais

suscetíveis à colonização por uma ampla gama de microrganismos, incluindo fungos (Barros et al., 2023), o que corrobora com nossos resultados. Esse ambiente mais dinâmico e sujeito a variações ambientais favorece a presença de uma maior diversidade microbiana. Em contraste, as raízes estão localizadas em um ambiente mais protegido, frequentemente interagindo com uma comunidade microbiana distinta, influenciada por fatores do solo, como pH, nutrientes e interações com micorrizas, o que resulta em uma composição microbiana específica, adaptada a esse ambiente mais estável e com menor variação de condições externas. O tipo de tecido, as características fisiológicas e bioquímicas das folhas e raízes podem influenciar a colonização fúngica. Por exemplo, as raízes tendem a hospedar comunidades endofíticas menos diversificadas que as folhas, pois o ambiente radicular possui menor variabilidade microambiental, está mais exposto a bioinsumos e nutrientes aplicados ao solo e, frequentemente, apresenta uma estrutura mais complexa e uma interação direta com o solo, como as micorrizas, o que pode favorecer a presença de fungos endofíticos (Saikkonen et al., 2013). Ainda, a função ecológica dos fungos endofíticos nas raízes pode ser relacionada à promoção do crescimento das plantas e à proteção contra patógenos do solo, enquanto os fungos nas folhas podem estar mais envolvidos na defesa contra herbívoros e no controle de doenças (Chapla; Biassetto; Araújo, 2012; Barros et al., 2023).

Além disso, o intervalo de coleta, inferior a 30 dias (março/abril de 2022), entre as amostras, bem como o período chuvoso, pode ter favorecido o crescimento e a prospecção de morfotipos com características fastidiosas. Outro aspecto importante a ser considerado é a influência sazonal sobre a diversidade microbiana endofítica em cana-de-açúcar. A sazonalidade das coletas realizadas neste trabalho, durante o período chuvoso, pode também ter influenciado positivamente a detecção das maiores médias encontradas nas raízes, em vez das folhas. Isso reforça a importância de considerar a sazonalidade e o tipo de insumo utilizado como fatores que afetam diretamente a diversidade de fungos endofíticos na cultura da cana-de-açúcar.

Quanto às características morfológicas dos morfotipos expressos, a textura e topografia apresentaram formas bem definidas. Entretanto, a variação na coloração das colônias, tanto na face superior quanto na inferior, foi diversificada. Essas condições podem estar atreladas à variabilidade da cepa e à plasticidade fenotípica (Bernardi-Wenzel et al., 2012).

No entanto, a maioria dos fungos expressos demonstrou-se fastidiosa quando repicada em meio artificial, no caso desta pesquisa, o BDA (Batata-Dextrose-Ágar), pois, ou não se desenvolveu, ou apresentou colônias com características macroscópicas diferentes das

iniciais. Isso dificultou a seleção para preservação e reduziu drasticamente a quantidade de fungos expressos para identificação molecular.

Pesquisas sobre fungos endofíticos na cana-de-açúcar ainda são escassas, apesar do potencial significativo que esses microrganismos têm para contribuir para a saúde das plantas e a produtividade agrícola (Kumar et al., 2018). A escassez de investigações direcionadas ao entendimento da interação entre esses fungos e a planta hospedeira limita a possibilidade de utilização desses microrganismos como agentes de biocontrole ou como biofertilizantes, o que poderia trazer benefícios econômicos e sustentáveis para a cultura (Vega et al., 2014). Portanto, é importante que mais estudos sejam realizados para elucidar a biodiversidade dos fungos endofíticos na cana-de-açúcar e seu potencial para melhorar a saúde da planta e a eficiência produtiva.

9.2 Prospecção dos fungos edáficos

Os solos são considerados importantes reservatórios de diversos microrganismos, incluindo os fungos (ALVES, 1998). Para os resultados da prospecção dos fungos edáficos, foram obtidos 96 isolados no total. Comparando-se com a prospecção dos fungos endofíticos, com 480 isolados, constatou-se uma proporção de cinco isolados endofíticos para um isolado edáfico. Essa proporção pode ter sido influenciada pela variação da quantidade de violeta de genciana utilizada na composição do meio de cultura, que foi de 5 mL para os meios utilizados na coleta I e 2,5 mL para os meios utilizados na coleta II. A violeta de genciana (ou cristal violeta) não é considerada exatamente um antibiótico, mas age como um agente antimicrobiano e pode funcionar como um inibidor de crescimento para certos microrganismos. Esse composto pertence à classe dos corantes de trifenilmetano e é usado principalmente como um agente bacteriostático e fungistático, ou seja, inibe o crescimento de bactérias e fungos, mas não necessariamente os mata. Sua ação inibitória se dá pela capacidade de se ligar a ácidos nucleicos e estruturas celulares, interferindo na replicação e no crescimento de microrganismos (Nascimento et al., 2014).

As diferenças detectadas na expressão dos isolados edáficos podem ser explicadas pela variabilidade na ecologia dos ambientes de solo, pois, no caso, as amostras são de monocultura, além das alterações devido aos ajustes técnicos, como a quantidade de violeta de genciana utilizada no meio de cultura. Assim, a diferença na quantidade de violeta

de genciana, somada às distintas condições de habitat dos fungos edáficos, possivelmente contribuiu para a variação nas taxas de isolamento observadas.

9.3 Espécies identificadas

A ubiquidade dos fungos é indiscutível, pois estes podem ser encontrados em diferentes ecossistemas e em diferentes hospedeiros. Os resultados da análise molecular das cepas obtidas nas coletas I e II indicaram a predominância de fungos do gênero *Fusarium*, particularmente associados ao *Fusarium oxysporum* species complex, com um número significativo de isolados identificados como *F. oxysporum* com alta confiabilidade, variando entre 98% e 100% de correspondência de bases nas regiões ITS e TEF. Esse complexo de espécies é amplamente conhecido tanto por sua ubiquidade em ambientes agrícolas quanto por suas relações simbióticas e patogênicas em diversas culturas, o que poderia sugerir a adaptação dessas cepas às condições do sistema agrícola da cana-de-açúcar (Alexopoulos et al., 1996). Apesar de este gênero de fungo ser considerado fitopatogênico em diversas culturas, como na cultura do feijão, causando podridão radicular e murcha, inclusive em cana-de-açúcar, *F. oxysporum* foi detectado neste trabalho como endófito da cana-de-açúcar (Michereff et al., 2005; Lucas et al., 2023).

A presença consistente de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin nas amostras é outro destaque importante. *B. bassiana* é um fungo entomopatogênico amplamente utilizado em controle biológico, especialmente para pragas agrícolas (Alves, 1998; Azevedo, 1998). Além disso, *B. bassiana* é bastante conhecido por sua capacidade de infectar uma ampla gama de insetos em quase todas as ordens. A variabilidade genética deste fungo é alta, o que lhe permite distribuir-se por todo o mundo, de áreas temperadas a tropicais, incluindo sua adaptabilidade às mudanças nas condições bióticas e abióticas. *B. bassiana* tem propriedades exclusivas além de seu desempenho entomopatogênico, pois pode ser encontrado como endofítico, apresentar atividades antagônicas contra patógenos vegetais, colonizar a rizosfera e viver saprofiticamente no solo (Roswanjaya; Saryanah; Devy, 2021). Nesta pesquisa, foi encontrado como endofítico na cana-de-açúcar, que é monocultura, e pode ter seu translocamento facilitado pelo uso de práticas agrícolas envolvendo bioinsumos na lavoura, corroborando sua importância para a microbiota local e seu potencial biocontrolador.

Outros gêneros identificados nas amostras desta pesquisa incluem *Penicillium chrysogenum* group, que são fungos comumente encontrados no ar, *Trichosporon asahii* e

Aspergillus sojae, que são conhecidos por sua atividade em processos de decomposição orgânica e associações simbióticas, além da produção de metabólitos de interesse industrial (Yoshimi, Akira et al. 2022). A presença de *Purpureocillium lilacinum* também merece destaque, dado o papel desse fungo como antagonista de nematoides (Isaac; El-deniny; Taha, 2021), o que sugere seu envolvimento em interações ecológicas específicas ou um possível papel biocontrolador no solo e na rizosfera da cana-de-açúcar.

Apesar da prospecção de 576 isolados entre endofíticos e edáficos e o envio de apenas 17 para identificação molecular, sendo dessas apenas 7 espécies diferentes, esses resultados indicam uma diversidade funcional considerável, que pode ser observada nas imagens deste trabalho, refletindo a complexidade das interações microbianas nos sistemas edáficos e endofíticos associados à cana-de-açúcar. A detecção dessas espécies pode fornecer informações importantes sobre o potencial de uso de fungos nativos no manejo integrado de pragas e doenças, bem como na promoção da saúde do solo e da planta.

9.4 Experimentos de patogenicidade em condições de laboratório

9.4.1 Experimento com inseto-teste *Galleria mellonella*

Com base no gráfico, observamos a mortalidade de *Galleria mellonella* em resposta à aplicação de diferentes fungos endofíticos isolados de cana-de-açúcar nas coletas I e II. Os dados mostram uma variação considerável nas taxas de mortalidade entre os isolados, com alguns alcançando até 70-80% de mortalidade, enquanto outros tiveram uma eficácia menor.

Essas diferenças na mortalidade das larvas de *G. mellonella* podem ser explicadas pela variação nas características bioativas e nos mecanismos de patogenicidade entre os diferentes isolados de fungos endofíticos. Os morfotipos USAFC2A1, USJFC6B1 e USJFC9C1 utilizados nos experimentos foram identificados como cepas de *Beauveria bassiana*, que é conhecida por sua eficácia como agente entomopatogênico devido à sua habilidade de infectar insetos por meio de penetração na cutícula (Alves, 1998; Azevedo, 2008), o que pode justificar as altas taxas de mortalidade observadas nos isolados testados. Os fungos endofíticos que apresentaram menor eficiência de mortalidade podem ter menor adaptação para patogenicidade em insetos ou mecanismos menos eficazes de infecção em *G. mellonella*. No entanto, é importante lembrar que este experimento foi realizado sem

repetições, sendo indicados estudos adicionais nas mesmas condições laboratoriais para avaliar a consistência do desempenho obtido para *G. mellonella*.

9.4.2 Experimentos com adultos de *S. levis* x fungos endofíticos

Foi possível realizar experimentos com três isolados: USJFC6B1 identificado como *Beauveria bassiana*, ATFC5A2 identificado como *Trichosporon asahii* e USARC10C2 identificado como *Fusarium oxysporum species complex* (foetens) (Tabela 21).

Tabela 21– Média de mortalidade de *Sphenophorus levis* infectados com suspensão fúngica de conídios aéreos de fungos endofíticos aplicados por imersão em condições de laboratório

Tratamentos (n=125) ¹	Exp. endofítico	Exp. endofítico	Exp. endofítico
	USJFC6B1	ATFC5A2	USARC10C2
*T1 Testemunha	0,6 ± 0,89 ab	0,4 ± 0,54 b	0,6 ± 0,89 b
T2 1 x 10 ⁶	3,0 ± 1,58 a	1,8 ± 1,78 ab	4,0 ± 1,22 a
T3 1 x 10 ⁷	0,2 ± 0,44 b	0,2 ± 0,44 b	3,0 ± 1,41 ab
T4 1 x 10 ⁸	0,8 ± 1,30 ab	0,8 ± 0,83 b	2,6 ± 2,30 ab
T5 5 x 10 ⁸	2,6 ± 2,30 ab	3,0 ± 1,22 a	3,4 ± 1,51 ab
CV (%)	100,63	87,60	56,71

T1= água, média seguida de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Esses resultados indicam que os isolados endofíticos testados têm efeitos variáveis em resposta às diferentes concentrações de esporos aplicados. A resposta dose-dependente observada em USJFC6B1 e ATFC5A2 sugere que concentrações moderadas (T2 1x10⁶ e T5 5x10⁸) podem ser mais eficazes, o que é um padrão interessante para futuras aplicações em campo. Já o isolado USARC10C2 mostrou maior consistência, sugerindo que ele pode ser uma opção mais confiável em termos de eficácia biocontroladora em diferentes concentrações. Essas diferenças podem ser atribuídas às características específicas de cada isolado, como a produção de enzimas, a habilidade de colonização e o nível de virulência (Schmidell; Zanfonato, 2021). Esse padrão demonstra a importância de ajustar as concentrações dos agentes endofíticos para otimizar os efeitos, considerando a variabilidade entre os isolados e a resposta do organismo-alvo. Além disso, o alto coeficiente de variação, especialmente para USJFC6B1 – *B. bassiana*, sugere a necessidade de mais estudos, uma vez que este fungo já é comprovadamente eficiente contra pragas agrícolas. Já para o morfotipo USARC10C2 – *Fusarium oxysporum species complex*, os resultados de maior mortalidade podem indicar que a cepa desenvolveu mecanismos de adaptação para viver endofiticamente,

já que é conhecido por ser um fungo agente causal da podridão-de-raízes em erva-mate (Quevedo et al., 2022). No entanto, sugere-se mais pesquisas para ajustes e avaliações específicas para constatação dos seus efeitos de patogenicidade em *S. levis*.

9.4.3 Experimentos com adultos de *S. levis* x fungos edáficos

Foi possível realizar experimentos com dois isolados de origem edáfica: morfotipo USASC8A1 identificado como *Penicillium chrysogenum* group e o morfotipo ATSC2C1 identificado *Aspergillus sojae* (Tabela 22).

Tabela 22 – Média de mortalidade de *Sphenophorus levis* infectados com suspensão fúngica de conídios aéreos de fungos edáficos aplicados por banho em condições de laboratório

Tratamentos (n=125) ¹	Exp. Edáfico	Exp. Edáfico	Exp. edáfico
	USASC8A1	ATSC2C1	ATSC2C1 rep
*T1 Testemunha	0,4 ± 0,89 b	0,8 ± 1,30 b	0,6 ± 0,89 a
T2 1 x 10 ⁶	4,0 ± 2,23 a	1,6 ± 2,30 b	0,6 ± 0,89 a
T3 1 x 10 ⁷	0,0 ± 0,00 b	0,8 ± 1,78 b	2,2 ± 2,28 a
T4 1 x 10 ⁸	0,2 ± 0,44 b	0,8 ± 1,30 b	1,8 ± 2,04 a
T5 5 x 10 ⁸	1,2 ± 1,78 b	5,0 ± 0,00 a	2,2 ± 1,30 a
CV (%)	116,93	85,70	107,68

T1= água, média seguida de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

A taxonomia do gênero *Aspergillus* sp. é complexa. Conforme Pildain et al., *A. sojae* e *A. toxicarius* não têm sido claramente distintos de *A. parasiticus*. Também, as espécies *Aspergillus sojae*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, e *A. oryzae* apresentam elevado parentesco genético, evidenciado por sua similaridade no DNA e tamanhos genômicos similares. Estudos comparativos revelaram que *A. flavus* e *A. oryzae*, assim como *A. parasiticus* e *A. sojae*, são extremamente difíceis de distinguir, uma vez que a complementaridade de seus genomas mostra uma similaridade de 100% entre *A. flavus* e *A. oryzae*, e de 91% entre *A. parasiticus* e *A. sojae* (Geiser; Pitt; Taylor, 1998; Geiser et al., 2000; Samson et al., 2000; Chang; Ehrlich; Hua, 2006). Esses resultados indicam uma relação genética muito próxima, o que pode ter implicações significativas para o entendimento da evolução e da funcionalidade desses organismos, especialmente no contexto de sua utilização biotecnológica (Silva et al., 2015).

Em relação ao potencial para controle biológico, *A. sojae* pode inibir o crescimento de fungos patogênicos como os que causam a doença do mofo branco no feijão (Atallah et al., 2022) e cepas não toxigênicas de *A. sojae* podem ter eficácia na prevenção da contaminação por toxinas em culturas como amendoim e milho (Dorner; Hole; Corner, 2000). Embora *A. sojae* seja conhecida principalmente por suas propriedades antifúngicas, seu papel

no manejo de pragas é parte de uma tendência mais ampla de usar fungos como agentes de biocontrole contra várias ameaças agrícolas (Shishupala, 2022).

Nos experimentos realizados com adultos de *S. levis*, embora o isolado ATSC2C1 tenha apresentado a maior média de mortalidade (5,0) e esporulação confirmada, a repetição ATSC2C1 teve uma menor média (2,2) e não houve esporulação. Coincidentemente, para os dois experimentos, o tratamento T5 com maior concentração (5×10^8 blastosporos/mL) foi o mais eficiente. No entanto, apesar das médias de mortalidade significativas, a alta variabilidade, como indicado pelo coeficiente de variação (CV) para cada tratamento, sugere que os resultados podem ter sido afetados por fatores experimentais ou biológicos, como a heterogeneidade do solo ou a variabilidade na resposta do inseto, sugerindo que há um limite para a eficácia dos fungos em relação ao controle de *S. levis*. Algumas espécies de *Aspergillus*, incluindo *A. sojae*, demonstraram eficácia no controle de pragas como *Elasmolomus pallens*, com taxas de mortalidade chegando a 100% em ambientes de laboratório (Umaru; Simarani, 2020). Assim, a continuidade de pesquisas e experimentos com *A. sojae* aplicados em adultos de *S. levis* é fundamental para entender melhor as interações entre o fungo e o inseto-alvo.

10. CONCLUSÕES

- A identificação macroscópica para os gêneros *Beauveria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. foi confirmada pela análise molecular para o nível de espécie.
- As espécies *Penicillium chrysogenum* group, *Fusarium oxysporum* species complex (Foetens), e *Aspergillus sojae* ocorrem tanto de forma endofítica quanto edáfica.
- Os fungos endofíticos *Beauveria bassiana*, *Fusarium oxysporum* species complex (Foetens) e *Penicillium chrysogenum* group apresentaram potencial de patogenicidade em larvas de *Galleria mellonella*.
- O fungo endofítico *Fusarium oxysporum* apresentou patogenicidade significativa em adultos de *S. levis* na maior dose aplicada (5×10^8 conídios/mL).

- O fungo edáfico *Aspergillus sojae* apresentou patogenicidade significativa em adultos de *S. levis* na maior dose aplicada (5×10^8 conídios/mL).

11. REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C. J. et al. **Introductory mycology**. New York, J. Wiley e Sons Inc., 4ª edição, 1996. 880 p

ALMEIDA, J. E. M. de. Biofábricas para produção de micopesticidas no Brasil: oportunidades de negócio e inovações / Bio-factories for the production of mycopesticides in Brazil: business opportunities and innovations. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 2444–2557, 2020. DOI: 10.34188/bjaerv3n3-162. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJAER/article/view/16950>. Acesso em: 14 mar. 2024.

ALTERTHUM, F. et al. Biotecnologia Industrial. **Fundamentos**, v. 1, 2.ed., p. 15- 51, 2021.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**, 2.ed. Piracicaba: Fealq, 1998. p.289-381.

ARAÚJO, W. L. et al. **Manual de Isolamento de microrganismos endofíticos**. Esalq, Piracicaba, 2002, 86 p.

ATALLAH, O. O. et al., (2022) Polyphasic characterization of four *Aspergillus* species as potential biocontrol agents for white mold disease of bean. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 6, p. 626, 2022, doi: 10.3390/jof8060626.

AZEVEDO, J.L. Ecologia microbiana. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de (Ed.). Ecologia microbiana. Jaguariúna, **Embrapa Meio Ambiente**, 1998. 488 p. Disponível em:< http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Azevedo_Microrganismosendofiticos_000fdra p80702wx5eo0a2ndxyo89f39n.pdf >. Consulta em: 08 de set. de 2024.

AZEVEDO, E. , BARATA, M. (2018) Diversidade no reino Fungi e aplicações à Indústria, **Rev. Ciência Elem.**, V6(04):077. doi.org/10.24927/rce 2018.077

AZEVEDO, J.L. et al. **Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais**. In: Serafini LA, Barros MN, Azevedo JL (eds) Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria, 1st edn. eDUCS, Caxias do Sul, p. 233–268, 2002.

BARROS, B. N. D. et al., (2023) Avaliação do potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados a espécies vegetais de ocorrência amazônica: uma revisão. **CONTRIBUCIONES A LAS CIENCIAS SOCIALES**, [S. l.], v. 16, n. 11, p. 27211–27234, 2023. DOI: 10.55905/revconv.16n.11-147. Disponível em: <<https://ojs.revistacontribuciones.com/ojs/index.php/clcs/article/view/2774> > Acesso em: 20 mar. 2024.

BERNARDI-WENZEL, L. et al., (2012) Isolamento e atividade antagonística de fungos endofíticos de soja (*Glycine max.* (L.) Merrill). **SaBios: Ver. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.86-96, set-dez. ISSN:1980-0002.

BOGAS, A. C. et al., Endophytic fungi: an overview on biotechnological and agronomic potential Fungos endofíticos: uma visão geral sobre o potencial biotecnológico e agrônômico. **Brazilian Journal of Biology**, 2024, vol. 84, e258557 | <https://doi.org/10.1590/1519-6984.258557>

CARVALHO, S. B. G.; PEREIRA, M. Fungos endofíticos em raízes de *Prosthechea pachycephala* (Orchidaceae) da Serra do Cipo – MG. **Natureza online**, Santa Tereza-ES, 9 p. 2016. Disponível em: . Acesso em: 10 set. 2018

CASTELIANI, A. F. et al., (2020) Behavioral aspects of *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), damage to sugarcane and its natural infection by *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Rhabditidae) **Crop Protection**, v. 137, p. 105262, 2020.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, 2013, 5 (3), 421-437. Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/e299986b-1407-4469-bc08-51480c60dc1e/content>> Acesso em: 22 de Ago. 2024.

CHASE, A. R.; OSBORNE, L. S.; FERGUSON, V. M. Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. **Florida Entomologist**, p. 285-292, 1986.

CUZZI, C.; LINK, S.; VILANI, A.; ONOFRE, S.B. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (ASTERAECEAE). **Global Science and Technology**, v. 04, n. 02, p.47-57, maio/ago. 2011.

DORNER, J. W.; HORN, B. W.; COLE, R. J. **Non-toxigenic strain of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* for biocontrol of toxigenic fungi**. U.S. Patent n. 6,027,724, 22 fev. 2000.

EMBRAPA MEIO AMBIENTE, **Jornal do endofítico**, Disponível em: <<https://www.cnpma.embrapa.br/projetos/endofiticos/introducao.html>>. Acesso em: 11 de agosto, 2021.

FORZZA, R.C. et al., **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Vol. 1, 2010.

FREITAS, V.L.O, et al., Isolamento de fungos solubilizadores de fosfato e celulolíticos de uma pilha de rejeito - em processo de restauração - e no cerrado, no município de Papagaio, MG. **Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil**, São Lourenço – MG, set. 2009

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1±5 million species estimate revisited. **Mycol. Res.**, Madrid, Spain, v. 105, n. 12, p. 1422-1432, 14 dez. 2001.

HAWKSWORTH, D. L.; ROSSMAN, A.Y. Where are all the undescribed fungi? **Phytopathology**, v. 87, n. 9, p. 888-891, 1997.

HUANG, W.; SUN, D.; FU, J.; ZHAO, H.; WANG, R.; AN, Y. Effects of Continuous Sugar Beet Cropping on Rhizospheric Microbial Communities. **Genes**, v.11, p.13, 2020.

ISAAC, G. S.; EL-DERINY, M. M.; TAHA, R. G. Eficácia de *Purpureocillium lilacinum* AUMC 10149 como agente de biocontrole contra o nematoide *Meloidogyne incógnita* que infecta plantas de tomate. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e253451, 2021.

KUMAR, N. M. et al. Genetically modified organisms and its impact on the enhancement of bioremediation. **Bioremediation: applications for environmental protection and management**, p. 53-76, 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7485-1_4

LUCAS, S. S. et al. (2023), Fusariose no Semiárido Brasileiro: Impacto e danos em culturas agrícolas. In: Avanços da pesquisa e inovação em sistemas agrícolas: conjuntura das ciências agrárias. **Editora Científica Digital**, 2023. p. 21-41.

MELLO, S. C. M. Manual de Curadores de Germoplasma, Microorganismos: Fungos filamentosos. In: Sueli Corrêa Marques de Mello, Ailton Reis e João Batista Tavares da Silva. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 25 p., 2011. (Documento técnico 134).

MICHEREFF, S. J. et al. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J. et al. Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife, **Imprensa Universitária UFRPE**, p. 1–18, 2005.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. atual e ampliada, Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

NASCIMENTO, et al., 2014, Análise espectrofotométrica do corante violeta de genciana. Spectrophotometric analysis of the gentian violet dye. 2014. **Periódico Tchê Química**, vol. 11 N. 22, ISSN 1806-0374, ISSN 1806-9827 ISSN 2179-0302, Porto Alegre, RS. Brasil.

OLIVEIRA, C. M. et al., (2018), Controle de *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar utilizando *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 53(6), 683-691.

PILDAIN, M. B. et al. (2008), Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 3, p. 725-735, June 2008.

PINOTTI, M. M. Z. et al. (2011) Isolamento de Fungos benéficos de Solo associados ao manejo empregado em culturas de amora, framboesa e mirtilo no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, n. 1, p. 67-80, 2011.

RHO, H. et al., (2018) Do endophytes promote growth of host plants under stress? A meta-analysis on plant stress mitigation by endophytes. **Microbial ecology**, v. 75, p. 407-418. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1054-3>

ROSWANJAYA, Y. P.; SARYANAH N. A.; DEVI L. (2022). Conidia production of *Beauveria bassiana* in solid substrate fermentation using a biphasic system. First Asian PGPR Indonesian chapter international e-conference 2021, KnE life sciences, volume 2022, pages 648-663. DOI 10.18502/kls.v7i3.11169

RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA, disponível em: URL <http://www.rstudio.com/>.

- SANTOS, J. S. et al., Fungos micorrízicos arbusculares e endofítios “Dark Septate” no desenvolvimento da biomassa do capim vetiver. **Revista Caatinga**, v. 31, n. 3, p. 602-611, 2018.
- SCHMIDELL, W.; ZANFONATO, K., *In*: Willibaldo et al. **Biotecnologia industrial-vol. 2: Engenharia bioquímica**. Editora Blucher, p. 06 – 90, 2021.
- SHISHUPALA, S. Biocontrol potential of fungi for pest and pathogen management. *In*: **Fungal diversity, ecology and control management**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. p. 557-575.
- SILVA, F. C. et al. Taxonomia polifásica para a identificação de *Aspergillus*, seção Flavi: uma revisão. 2015. **Revista Ifes Ciência**, nº 1, V.1, 2015, p. 18-40. Instituto Federal do Espírito Santo, ISSN: 2359-4799.
- SOUZA, J. B., et al. (2019), Atividade enzimática de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais e aromáticas. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental** (Pombal, PB) 13 (03) 05-22, jul./set. 2019.
- STROBEL G.A. et al. (2004), Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268. 2004.
- TOOFANEE, S. B., DULYNAMODE, R. Fungal endophytes associated with *Cordemoya integrifolia*. **Fungal Diversity**, 11: 169-175, 2002.
- UMARU, F. F.; SIMARANI, K. Evaluation of the potential of fungal biopesticides for the biological control of the seed bug, *Elasmolomus pallens* (Dallas)(Hemiptera: Rhyparochromidae). **Insects**, v. 11, n. 5, p. 277, 2020.
- VAN DER HEIJDEN, M. G. A. et al. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. **New Phytologist**, Cambridge, v. 205, n. 4, p. 1406-1423, 2015.
- YOSHIMI, Akira et al. Cell wall integrity and its industrial applications in filamentous fungi. **Journal of fungi**, v. 8, n. 5, p. 435, 2022.
- ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Report**, New York, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.

CAPÍTULO II

SELEÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA FERMENTAÇÃO LÍQUIDA SUBMERSA DE BLASTOSPOROS DE *Beauveria bassiana* IBCB170 e *Metarhizium anisopliae* IBCB383

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar a seleção de meio de cultura visando à obtenção de maior concentração de blastosporos/mL para os entomopatógenos *Beauveria bassiana* IBCB170 e *Metarhizium anisopliae* IBCB383. Foram realizadas duas seleções de meio: S.I-2022, com cinco tratamentos, e S.II-2023, com oito. Para cada tratamento, foram realizadas cinco repetições com 100 mL do meio de cultura dispostos em Erlenmeyers com deflatores, autoclavados e inoculados com 10 mL da suspensão fúngica em cada repetição, com concentrações de blastosporos/mL variando entre 1×10^8 e 6×10^8 para S.I-2022, e padronizada em 1×10^8 para S.II-2023. Após a inoculação, os meios ficaram sob agitação a 160 rpm, com amostragens realizadas em 72 horas para avaliação dos parâmetros: concentração de blastosporos/mL, pH, temperatura e UFC. Os meios que apresentaram maior média de concentração de blastosporos/mL foram testados em biorreator de bancada. Para as bateladas com inóculos da S.I-2022, foram realizados três experimentos para cada cepa, com duas repetições cada, com amostragens em 72 e 168 horas, e três volumes de inóculo: 50 mL, 150 mL e 250 mL em 4 L de meio. Para a S.II-2023, foram realizados dois experimentos para cada cepa, com duas repetições e amostragens em 72 horas, e dois volumes de inóculo: 50 mL e 150 mL. Em todas as bateladas, foram controlados os seguintes parâmetros: agitação a 300 rpm, vvm em 1, pH em $4,50 \pm 0,20$ e temperatura a 27°C , com amostragens realizadas para avaliação de UFC. Aos resultados foi aplicada ANOVA de Welch, seguida do teste de Tukey, por meio do software RStudio®. Para a S.I-2022, as maiores concentrações de blastosporos/mL nos testes em Erlenmeyers foram obtidas no meio T2 para S.I-2022 IBCB170, com $5,65 \times 10^8$, e no meio T4 para IBCB383, com $16,15 \times 10^8$. Para S.II-2023, o meio T2 apresentou $2,57 \times 10^8$ para IBCB170, e o meio T1, $1,298 \times 10^8$ para IBCB383. Nos testes com o biorreator, as maiores médias de concentração de blastosporos/mL foram obtidas na S.I-2022 para IBCB170 no meio T2 em 72 horas, com o volume de 150 mL, e para IBCB383 no meio T4, com o volume de 250 mL em 72 horas. Nos testes em biorreator para a S.II-2023, tanto para IBCB170 quanto para IBCB383, a maior média de blastosporos/mL foi obtida com o volume de 150 mL.

Palavras-chave: blastosporos. deflatores. biorreator de bancada. meio de cultura líquido

SELECTION OF CULTURE MEDIUM COMPOSITION FOR SUBMERGED LIQUID FERMENTATION OF BLASTOSPORES OF *Beauveria bassiana* IBCB170 AND *Metarhizium anisopliae* IBCB383

ABSTRACT

The objective of this study was to select culture media aimed at obtaining the highest concentration of blastospores/mL for the entomopathogens *Beauveria bassiana* IBCB170 and *Metarhizium anisopliae* IBCB383. Two media selection processes were conducted: S.I-2022, with five treatments, and S.II-2023, with eight. For each treatment, five replicates were performed, with 100 mL of culture medium placed in Erlenmeyer flasks with baffles, autoclaved, and inoculated with 10 mL of fungal suspension per replicate. Blastospores/mL concentrations ranged from 1×10^8 to 6×10^8 for S.I-2022 and were standardized at 1×10^8 for S.II-2023. After inoculation, the media were kept under agitation at 160 rpm, with sampling performed at 72 hours to evaluate the following parameters: blastospore concentration (blastospores/mL), pH, temperature, and CFU. The media with the highest average blastospore concentrations were tested in a bench-scale bioreactor. For the S.I-2022 inoculum batches, three experiments were carried out for each strain, with two replicates each. Sampling was performed at 72 and 168 hours, and three inoculum volumes were tested: 50 mL, 150 mL, and 250 mL in 4 L of medium. For S.II-2023, two experiments were conducted for each strain, with two replicates and sampling at 72 hours. Two inoculum volumes were tested: 50 mL and 150 mL. In all batches, the following parameters were controlled: agitation at 300 rpm, 1 vvm, pH at 4.50 ± 0.20 , and temperature at 27 °C, with sampling performed for CFU evaluation. The results were analyzed using Welch's ANOVA, followed by Tukey's test, using the RStudio® software. For S.I-2022, the highest blastospore concentrations in Erlenmeyer tests were obtained in medium T2 for S.I-2022 IBCB170, with 5.65×10^8 , and in medium T4 for IBCB383, with 16.15×10^8 . For S.II-2023, medium T2 yielded 2.57×10^8 for IBCB170, and medium T1 yielded 1.298×10^8 for IBCB383. In the bioreactor tests, the highest average blastospore concentrations were obtained in S.I-2022 for IBCB170 in medium T2 at 72 hours, with an inoculum volume of 150 mL, and for IBCB383 in medium T4, with an inoculum volume of 250 mL at 72 hours. In the bioreactor tests for S.II-2023, both for IBCB170 and IBCB383, the highest average blastospore concentrations were achieved with an inoculum volume of 150 mL.

Keywords: blastospores, baffles, bench-scale bioreactor, liquid culture medium

12. INTRODUÇÃO

O controle biológico de pragas por meio de fungos entomopatogênicos tem se destacado como uma alternativa promissora e sustentável em comparação aos métodos convencionais de controle químico (Alves, 1998; Parra, 2016; Pignati et al., 2017).

No Brasil, mais da metade dos biopesticidas tem em sua composição os fungos entomopatogênicos, com grande destaque para os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (Li et al., 2010; Mascarin et al., 2019; AgroFit, 2024). Nesse contexto, a formulação de meio de cultura para a produção desses fungos assume papel fundamental, uma vez que pode colaborar diretamente na inovação e obtenção de bioprodutos com boa eficácia e viabilidade econômica no manejo das pragas agrícolas (Faria, 2017; Mascarin et al., 2019; De-Sá-Santos, 2021).

As primeiras investigações sobre a fermentação líquida submersa para fungos entomopatogênicos remontam ao final do século XX, quando pesquisadores começaram a explorar métodos alternativos para o controle de pragas agrícolas. Inicialmente, esses estudos enfrentaram desafios técnicos significativos, como a seleção de cepas fúngicas adequadas, otimização das condições de cultivo (balanceamento dos nutrientes) e desenvolvimento de equipamentos para a obtenção de processos de fermentação eficientes (Pandey, 2003; Carvalho et al., 2018; Mascarin et al., 2019).

A fermentação líquida submersa (FLS) tem se destacado como uma técnica promissora na produção em larga escala de microrganismos como bactérias e fungos e tem desempenhado um papel importante no controle biológico de pragas agrícolas (Mascarin et al., 2018; Basso, 2023). A FLS também permite a produção de antibióticos, enzimas e outros produtos biotecnológicos, tornando-se essencial na biotecnologia industrial. Exemplo disso é o uso de fungos filamentosos, como *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., que produzem uma variedade de enzimas (como amilases e proteases) e compostos bioativos com aplicabilidade na indústria farmacêutica, alimentícia e ambiental (Alterthum et al., 2021; De-Sá-Santos, 2021). Entretanto, o controle preciso dos parâmetros operacionais na FLS é crítico para alcançar altas concentrações dos produtos de interesse, reduzir custos e aumentar a eficiência do processo, o que evidencia a importância contínua da pesquisa em otimização de condições fermentativas e desenvolvimento de novos bioprocessos industriais (Schmidell; Zanfonato, 2021; Mascarin et al., 2024).

A estrutura mais utilizada para formulações de fungos entomopatogênicos (FE) é o conídio aéreo e a fermentação líquida submersa (FLS) emergiu como uma alternativa na

busca por otimização de estruturas como os blastosporos, que são utilizados em cerca de 4% dos biopesticidas. Com o passar do tempo, aprimoramentos tecnológicos e científicos permitiram avanços na fermentação líquida submersa para esses organismos, visando a otimização dessas estruturas mais infectivas (Faria; Wraight, 2007; Mascarin et al., 2019).

Novas pesquisas para desenvolvimento de meios de cultura e os métodos de controle de processos da FLS têm resultado em aumento da eficiência de produção e qualidade dos blastosporos. Além disso, a compreensão mais profunda da fisiologia dos fungos e suas interações com o hospedeiro é de grande importância para a escolha dos componentes para elaboração de novos meios de cultura e formulações (Mascarin et al., 2019; Alterthum, 2021; De-Sá-Santos, 2021).

Os conídios aéreos possuem uma estrutura protetora composta de quitina (polissacarídeo) que garante melhor resistência tanto no ambiente natural quanto no manuseio de formulações em laboratório. Já os blastosporos são estruturas reprodutivas assexuadas desses fungos que também possuem bom potencial infectivo para controle de pragas, mas não são muito utilizados devido a algumas limitações, como facilidade de dessecação e baixa durabilidade no tempo de prateleira (Alves; Faria, 2010; Gandarilla-Pacheco et al., 2017; Schmidell; Zanfonato, 2021). No entanto, existem estudos que apontam os blastosporos como estrutura promissora para o uso no desenvolvimento de bioinseticidas (Hartelt et al., 2008; Mascarin et al., 2008).

No caso da elaboração e desenvolvimento de meio de cultura para FLS, é necessário a seleção da cepa e o balanceamento de nutrientes, tais como fontes de carbono e nitrogênio, além de vitaminas e sais. Além disso, é importante conhecer o hospedeiro para que se possa, de maneira artificial, proporcionar maior similaridade da hemolinfa com o novo meio de cultura a ser testado (Mascarin et al., 2014; Cojano; Lumînare, 2021; Schmidell; Zanfonato, 2021).

O uso de equipamentos como Erlenmeyers com deflatores, mesa agitadora orbital e biorreator de bancada, juntamente com práticas adequadas de esterilização, desinfecção e assepsia, é fundamental para a produção eficiente de estruturas microbianas. Essas condições permitem o controle preciso de parâmetros de crescimento, como pH, aeração e agitação, além de minimizar a contaminação e garantir a obtenção de boas quantidades das estruturas desejadas no bioproduto fermentado (Carvalho et al., 2018; Alterthun et al., 2021; Schmidell; Zanfonato, 2021).

Assim, a realização de pesquisas para o desenvolvimento do meio de cultura líquido para FLS com blastosporos de *B. bassiana* e *M. anisopliae* é de grande importância quando se pensa em inovação na formulação de bioinseticidas no controle de pragas agrícolas.

13. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi realizar a seleção de meio de cultura visando à obtenção de maior concentração de blastosporos/mL para os entomopatógenos *Beauveria bassiana* IBCB170 e *Metarhizium anisopliae* IBCB383.

14. MATERIAL E MÉTODOS

14.1 Seleção e origem das cepas

A maioria das cepas identificadas e usadas comercialmente está geralmente depositada em micotecas de instituições de pesquisa ou em empresas de controle biológico. No caso das cepas escolhidas para o desenvolvimento deste trabalho, as cepas IBCB170 de *Beauveria bassiana* e IBCB383 de *Metarhizium anisopliae* pertencem à micoteca 'Oldemar Cardim de Abreu', localizada na Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico, do Centro Avançado de P&D em Sanidade Agropecuária (CAPSA), do Instituto Biológico de Campinas, SP.

A cepa IBCB170 de *B. bassiana* foi coletada e isolada do solo da cultura de cana-de-açúcar em Iracemópolis, São Paulo, pelo pesquisador Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida (Figura 74).



Figura 74 - Colônias de *Beauveria bassiana* IBCB170. Imagem: Pereira, R.M.C., 2023.

A cepa IBCB383 de *M. anisopliae* foi coletada e isolada da carcaça de *Mahanarva fimbriolata*, em Água Branca, SP, pelo pesquisador Dr. Luis Garrigós Leite (Figura 75).



Figura 75 – Colônias de *Metarhizium anisopliae* IBCB383. Imagem: Pereira, R.M.C., 2023.

Para as duas cepas, foram realizadas repicagens periódicas com o objetivo de obtenção de conídios aéreos para preparo de suspensões fúngicas, posteriormente utilizadas na inoculação dos meios de cultura testados.

14.2 Balanceamento dos componentes

Basicamente, o meio de cultura para produção de fungos filamentosos é composto de fontes de carbono, nitrogênio e sais (Parveen; Jeyarani; Jayapradha, 2021; Schmidell; Zanfonato, 2021; Roswanjaya; Saryanah; Devy, 2022). Para o balanceamento dos

componentes dos meios para fermentação líquida de IBCB170 e IBCB383, foi determinada a proporção de C:N, cujos componentes escolhidos foram: sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) ou glicose D-glicose-anidra ($C_6H_{12}O_6$) como fonte de carbono, extrato de levedura ou peptona de soja como fonte de nitrogênio orgânico, nitrato de amônio (NH_4NO_3) ou sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$) como fonte de nitrogênio inorgânico. Foi também determinado oito tipos de sais: nitrato de sódio ($NaNO_3$), cloreto de potássio (KCl), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), sulfato de magnésio ($MgSO_4$), sulfato ferroso heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), sulfato de manganês heptahidratado ($MnSO_4 \cdot 7H_2O$), sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) e cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$).

Para ambas as cepas, as quantidades iniciais dos componentes para o balanceamento inicial foram determinadas conforme a Tabela 23.

Tabela 23 – Componentes básicos para desenvolvimento de meio de cultura para fermentação líquida de IBCB170 e IBCB383, quantidades proporcionais ao balanceamento em g/L

Fonte	Quantidade (g/L)
$C_{12}H_{22}O_{11}$	52,0g
Extrato de levedura	41,7g
$NaNO_3$	1,6
KCl	1,0
KH_2PO_4	0,36
$MgSO_4$	0,60
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,50
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,60
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,14
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,40
Sulfato de amônio	6,24
Nitrato de amônio	6,24

14.3 Seleção nutricional para meio de cultura para IBCB170 e IBCB383 em Erlenmeyers

Para o desenvolvimento de meio de cultura para produção de blastosporos de IBCB170 e IBCB383, foram realizadas duas seleções com variações nas fontes de carbono e nitrogênio, sendo a seleção um denominada S.I-2022 e a seleção dois denominada S.II-2023.

Na seleção um, S.I-2022, para as duas cepas, foram testados cinco tratamentos, com quatro repetições cada e com variações nas fontes de nitrogênio (N). Ainda, houve o diferencial de adição ou não adição de complexo vitamínico (manipulado) contendo: tiamina ($C_{12}H_{17}N_4OS$), riboflavina ($C_{17}H_{20}N_4O_6$), pantotenato de cálcio ($C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$), niacina ($C_6H_5NO_2$), piridoxamina ($C_8H_{12}N_2O_2$), ácido fólico ($C_{19}H_{19}N_7O_6$), biotina ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$) e B12 ($C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$). O experimento com complexo vitamínico foi testado apenas para a cepa IBCB170 (Tabela 24).

Tabela 24 – Variação da fonte de Nitrogênio e complexo vitamínico nos de tratamentos S.I-2022**

Tratamentos	Variação N	g/500 mL	IBCB170 e IBCB383	
1	Extrato levedura	3,89	* + c.v.	- c.v.
2	Nitrato de amônio	2,49	* + c.v.	- c.v.
3	Sulfato de amônio	2,49	* + c.v.	- c.v.
4	Extrato de levedura + Nitrato de amônio	3,89 + 2,49	* + c.v.	- c.v.
5	Extrato de levedura + Sulfato de amônio	3,89 + 2,49	* + c.v.	- c.v.

*+ c.v.= com 1,51g do complexo vitamínico e - c.v.= sem complexo vitamínico

**S.I-2022: S= Seleção; I= um; 2022= ano do desenvolvimento.

Na seleção dois, S.II-2023, para as duas cepas, foram testados oito tratamentos, com cinco repetições cada, mantendo-se as quantidades utilizadas para os sais da S.I-2022 e com variações nas fontes de carbono e nitrogênio, sendo retirado o complexo vitamínico (Tabela 25).

Tabela 25 – Variação nas fontes de carbono e nitrogênio para os tratamentos de *S.II-2023

Tratamento	C	g/500 mL	N	g/500 mL
1	Sacarose	26	Nitrato de amônio	3,12
			Extrato de levedura	4,87
2	D-glicose anidra	26	Nitrato de amônio	3,12
			Extrato de levedura	4,87
3	D-glicose anidra	13	Nitrato de amônio	3,12
			Extrato de levedura	4,87
4	D-glicose anidra	13	Extrato de levedura	4,87
			Nitrato de amônio	3,12
5	D-glicose anidra	13	Peptona de soja	6
			Nitrato de amônio	3,12
6	Sacarose	26	Peptona de soja	6
			Nitrato de amônio	3,12
7	D-glicose anidra	26	Peptona de soja	6
			Nitrato de amônio	3,12
8	D-glicose anidra	13	Peptona de soja	6

*S.II-2023: S= Seleção; II= um; 2023= ano do desenvolvimento.

Tanto para S.I-2022 quanto para S.II-2023, após a pesagem dos componentes, estes foram diluídos em 500 mL de água deionizada e autoclavada. Em seguida, o meio foi diluído, homogeneizado e dividido em cinco Erlenmeyers bafleados (com deflatores) e tampa de aço inoxidável, ficando cada repetição com 100 mL do meio (Figura 76).



Figura 76 – Parte do processo da seleção S.I-2022: a) pesagem dos componentes, b) Erlenmeyers com meio para cepa IBCB170 para autoclavagem. Imagem: Pereira, R.M.C., 2022.

Depois de distribuídos, os frascos foram autoclavados por 30 minutos a 121°C. Após o resfriamento, foram realizadas inoculações de 10 mL de suspensão fúngica, preparada com água destilada e autoclavada, misturada com conídios aéreos retirados por meio de raspagem de placas com colônias esporuladas. As concentrações das suspensões variaram entre 1×10^8 e 6×10^8 conídios/mL para S.I-2022, enquanto para S.II-2023 foi padronizada em 1×10^8 conídios/mL por Erlenmeyer. Para S.I-2022, os inóculos foram colocados em agitador orbital a 160 rpm, por sete dias consecutivos, sem controle de temperatura (Figura 77).



Figura – 77 Inóculos para a seleção S.I-2022 com IBCB383 em processo de fermentação em mesa orbital. Imagem: Pereira, R.M.C., 2023.

Para S.II-2023, os inóculos foram colocados em agitador orbital a 160 rpm, por sete dias consecutivos, com controle de temperatura a 27 ± 1 °C (Figura 78).



Figura – 78 Inóculos de IBCB170 para a seleção S.II-2023 em processo de fermentação em mesa orbital fechada e controle de temperatura. Imagem: Pereira, R.M.C., 2024.

Para as duas seleções, em 72 horas, foram retirados 10 mL de cada frasco para avaliações de: pH, concentração de blastosporos/mL e unidades formadoras de colônia (UFC). A medição do pH foi realizada com um pHmetro de bancada da marca Bel Engineering®. Para a contagem dos blastosporos, utilizou-se um microscópio óptico Axion® com ampliação de 400x e câmara de Neubauer, contendo 1 mL da diluição em 10^{-4} . A determinação das UFCs foi realizada em placas de Petri estéreis, com BDA (batata-dextrose-ágar) + 0,01% de

Terramicina (oxitetraciclina). Diluições de 10^{-4} foram pipetadas, com 100 μL transferidos para a placa. Para espalhar o meio, utilizou-se uma alça de Drigalski, devidamente flambada e esfriada, no BDA da placa antes do espalhamento. As placas foram então acondicionadas em uma câmara climatizada tipo BOD a $26 \pm 1^\circ \text{C}$ por cinco a sete dias, e realizadas contagens de UFCs.

Após as avaliações, tanto para S.I-2022 quanto para S.I-2023, foi selecionado o meio que apresentou maior média para a concentração de blastosporos/mL para ambas as cepas, sendo testado em bateladas no biorreator de bancada.

14.4 Experimentos com inóculos da S.I-2022 e S.II-2023 para IBCB170 e IBCB383 em Biorreator de bancada

Os meios obtidos das seleções S.I-2022 e S.II-2023 para IBCB170 e IBCB383 foram testados em biorreator de bancada. Para as bateladas da seleção S.I-2022, foi utilizado o biorreator tipo STR-Tecnal® (Figura 79).



Figura 79 – Biorreator de bancada em processo de fermentação: a) chiller; b) torre de comando; c) vaso com as sondas; QRcode para acesso ao vídeo no Youtube. Imagem e QRcode: Pereira, R.M.C., 2023.

Estudos em biorreator podem apresentar diversas variações nas configurações dos parâmetros, como agitação, oxigenação e pH (Alterthum et al., 2021). Para os testes desta pesquisa, o delineamento das bateladas foi definido conforme as tabelas 26 e 27.

Tabela 26 – Delineamento de bateladas com o inóculo de maior concentração obtido da seleção de meio de cultura S.I-2022*

Teste	Repetição	Proporção inóculo x meio de cultura	rpm	pH + controle com ácido e base	Temperatura ° C	vvm**
1	1	IBCB170 250 mL : 4L	300	4,5± 0,20	27	1
1	2	IBCB170 250 mL : 4L	300	4,5± 0,20	27	1
2	1	IBCB170 150 mL : 4L	300	4,5± 0,20	27	1
2	2	IBCB170 150 mL : 4L	300	4,5± 0,20	27	1
3	1	IBCB170 50 mL : 4L	300	4,5± 0,20	27	1
3	2	IBCB170 50 mL : 4L	300	4,5± 0,20	27	1
1	1	IBCB383 250 mL : 4L	300	4,5± 0,20	27	1
1	2	IBCB383 250 mL : 4L	300	4,5± 0,20	27	1
2	1	IBCB383 150 mL : 4L	300	4,5± 0,20	27	1
2	2	IBCB383 150 mL : 4L	300	5,5± 0,20	27	1
3	1	IBCB383 50 mL : 4L	300	4,5± 0,20	27	1
3	2	IBCB383 50 mL : 4L	300	4,5± 0,20	27	1

*S.I-2022: S= Seleção; I= um; 2022= ano do desenvolvimento.

**vvm = volume – vaso – minuto

Tabela 27 – Delineamento de bateladas com o inóculo de maior concentração obtido da seleção do meio de cultura S.II-2023*

Teste	Repetição	Proporção inóculo x meio de cultura	rpm	pH + controle com ácido e base	Temperatura ° C	**vvm
1	1	IBCB170 150 mL : 4L	300	4,5± 0,20	27	1
1	2	IBCB170 150 mL : 4L	300	4,5± 0,20	27	1
2	1	IBCB170 50 mL : 4L	300	4,5± 0,20	27	1
2	2	IBCB170 50 mL : 4L	300	4,5± 0,20	27	1
1	1	IBCB383 150 mL : 4L	300	4,5± 0,20	27	1
1	2	IBCB383 150 mL : 4L	300	5,5± 0,20	27	1
2	1	IBCB383 50 mL : 4L	300	4,5± 0,20	27	1
2	2	IBCB383 50 mL : 4L	300	4,5± 0,20	27	1

*S.II-2023: S= Seleção; II= dois; 2023= ano do desenvolvimento.

**vvm = volume – vaso – minuto

Antes de cada batelada ser autoclavada, o meio de cultura foi ajustado para o parâmetro de pH em 4,50. Em seguida, seguiram-se os procedimentos para a preparação do biorreator para autoclavagem: fechamento da tampa, verificação das portas, pinçamento das mangueiras, proteção dos sensores com papel alumínio e proteção dos filtros com algodão hidrofóbico e papel alumínio. O equipamento foi transportado e colocado para autoclavagem por 30 minutos a 121° C (Figura 80).

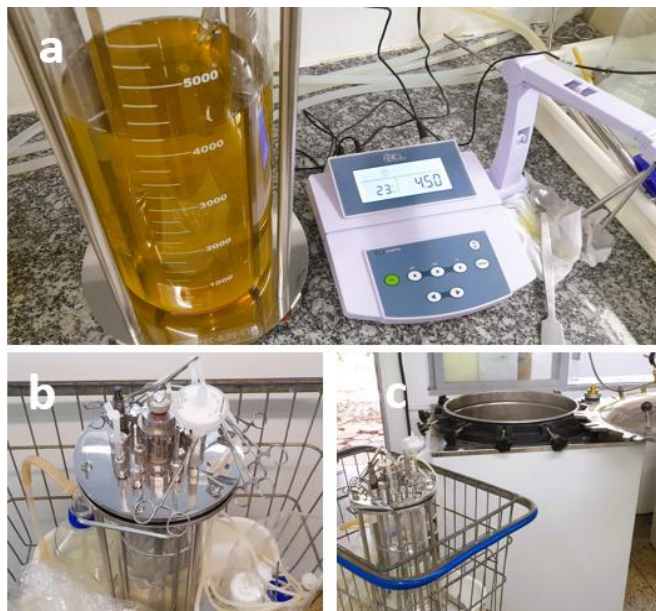


Figura 80 – Registros realizados durante o preparo das bateladas; a) medição e estabilização do pH; b) equipamento vedado e pinçado; c) equipamento para colocação na autoclave. Imagens: Pereira, R.M.C., 2023.

Das bateladas, foram retiradas amostras em 72h e 168h, com volume de 200 mL do meio, em Erlenmeyer autoclavado. De cada amostra, foram pipetados 10 mL do meio para medição do pH em pHmetro de bancada e 1 mL para realização da diluição seriada para plaqueamento e contagens de UFC. A concentração de blastosporos/mL para cada amostra foi determinada após contagem em câmara de Neubauer sob microscópio óptico em ampliação de 400x (Figura 81).

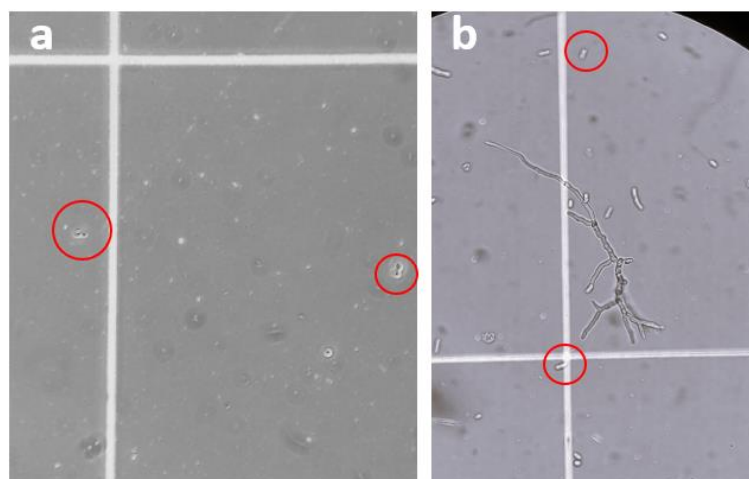


Figura 81 – Registros realizados durante as avaliações de amostras do biorreator; a) em destaque, blastosporos de *Beauveria bassiana* IBCB170 S.I-2022 em 72h; b) em destaque blastosporos de *Metharhizium anisopliae* IBCB383 S.I-2022 em 168h. Imagens: Pereira, R.M.C., 2023.

14.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados usando um delineamento fatorial completamente randomizado com dois fatores (tempo com dois níveis e volume com três níveis) e duas repetições. Foi realizada uma transformação de dados para obter dispersões aproximadamente iguais ou relações aditivas entre os dados. A análise foi feita com ANOVA de Welch, e os resíduos foram testados pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, com aplicação do teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software RStudio®.

15. RESULTADOS

15.1 Seleção nutricional para meio de cultura para IBCB170 e IBCB 383 em Erlenmeyers

Para a determinação do meio de cultura com maior concentração de blastosporos/mL, foi considerada a maior média das cinco repetições. Para a seleção S.I-2022, em relação à cepa IBCB170, o melhor resultado foi obtido no tratamento 2 (T2), com uma média de $5,65 \times 10^8$ blastosporos/mL (Tabela 28). Para a cepa IBCB383, o melhor resultado foi obtido no tratamento 4 (T4), com uma média de $16,15 \times 10^8$ blastosporos/mL (Tabela 29).

Tabela 28 – Médias de concentração de blastosporos/mL e modulação natural do pH de amostras com 72h para os tratamentos testados na seleção S.I-2022* para a cepa IBCB170

Tratamentos	+ complexo vitamínico**	pH	10^8 Blastosporos/mL
T1	Extrato levedura	5,15	1,16
T2	Nitrato de amônio	3,71	5,65
T3	Sulfato de amônio	2,37	5,12
T4	Extrato de levedura + Nitrato de amônio	3,88	3,03
T5	Extrato de levedura + Sulfato de amônio	3,68	2,68

*S.I-2022: S= Seleção; I= um; 2022= ano do desenvolvimento.

** Tiamina, riboflavina, pantotenato de cálcio, niacina, piridoxamina, ácido fólico, biotina, e complexo B12.

Tabela 29 – Médias de concentração de blastosporos/mL e modulação natural do pH de amostras com 72h para os tratamentos testados na seleção S.I-2022* para a cepa IBCB383

	sem complexo vitamínico**	pH	10^8 Blastosporos/mL
T1	Extrato levedura	4,97	4,03
T2	Nitrato de amônio	1,07	6,06
T3	Sulfato de amônio	2,06	7,56
T4	Extrato de levedura + Nitrato de amônio	3,43	16,15
T5	Extrato de levedura + Sulfato de amônio	3,35	14,31

*S.I-2022: S= Seleção; I= um; 2022= ano do desenvolvimento.

** Tiamina, riboflavina, pantotenato de cálcio, niacina, piridoxamina, ácido fólico, biotina, e complexo B12.

Para a seleção S.II-2023, em relação à cepa IBCB170, o melhor resultado foi obtido no tratamento 2 (T2), com $2,57 \times 10^8$ blastosporos/mL (Tabela 30). Para a cepa IBCB383, o melhor resultado foi obtido no tratamento 1 (T1), com $1,298 \times 10^8$ blastosporos/mL (Tabela 31).

Tabela 30 – Médias de concentração de blastosporos/mL e modulação natural do pH de amostras com 72h para os tratamentos testados na seleção S.II-2023* para a cepa IBCB170

		+ complexo vitamínico**		pH	10 ⁸ Blastosporos/mL
	C	N			
T1	Sacarose	Nitrato de amônio Extrato de levedura		3,42	2,55
T2	D-glicose anidra	Sulfato de amônio Extrato de levedura		4,05	2,57
T3	D-glicose anidra	Nitrato de amônio Extrato de levedura		5,68	0,05
T4	D-glicose anidra	Extrato de levedura		5,29	0,05
T5	D-glicose anidra	Nitrato de amônio Peptona de soja		6,00	0,09
T6	Sacarose	Nitrato de amônio Peptona de soja		6,17	0,24
T7	D-glicose anidra	Nitrato de amônio Peptona de soja		6,19	1,25
T8	D-glicose anidra	Peptona de soja		5,11	2,09

*S.II-2023: S= Seleção; II= dois; 2023= ano do desenvolvimento.

** Tiamina, riboflavina, pantotenato de cálcio, niacina, piridoxamina, ácido fólico, biotina, e complexo B12.

Tabela 31 – Médias de concentração de blastosporos/mL e modulação natural do pH de amostras com 72h para os tratamentos testados na seleção S.II-2023* para a cepa IBCB383

		sem complexo vitamínico**		pH	10 ⁸ Blastosporos/mL
	C	N			
T1	Sacarose	Sulfato de amônio Extrato de levedura		2,49	1,298
T2	D-glicose anidra	Nitrato de amônio Extrato de levedura		2,83	0,002
T3	D-glicose anidra	Nitrato de amônio Extrato de levedura		5,36	0,027
T4	D-glicose anidra	Extrato de levedura		4,41	0,044
T5	D-glicose anidra	Nitrato de amônio Peptona de soja		5,2	0,008
T6	Sacarose	Nitrato de amônio Peptona de soja		3,94	0,001
T7	D-glicose anidra	Nitrato de amônio Peptona de soja		3,28	0,077
T8	D-glicose anidra	Peptona de soja		4,91	0,290

*S.II-2023: S= Seleção; II= dois; 2023= ano do desenvolvimento.

** Tiamina, riboflavina, pantotenato de cálcio, niacina, piridoxamina, ácido fólico, biotina, e complexo B12.

15.2 Experimentos com os inóculos da seleção S.I-2022 e S.II-2023 para IBCB170 e IBCB383 em biorreator de bancada

Nos experimentos I, II e III realizados em biorreator de bancada com o inóculo T2.S.I-2022 de IBCB170, a média de concentração de blastosporos/mL em 72h foi maior do que em 168h. Em relação ao volume, a maior média de concentração foi para 150 mL de inóculo, com $1,18 \times 10^8$ blastosporos/mL (Figura 82).

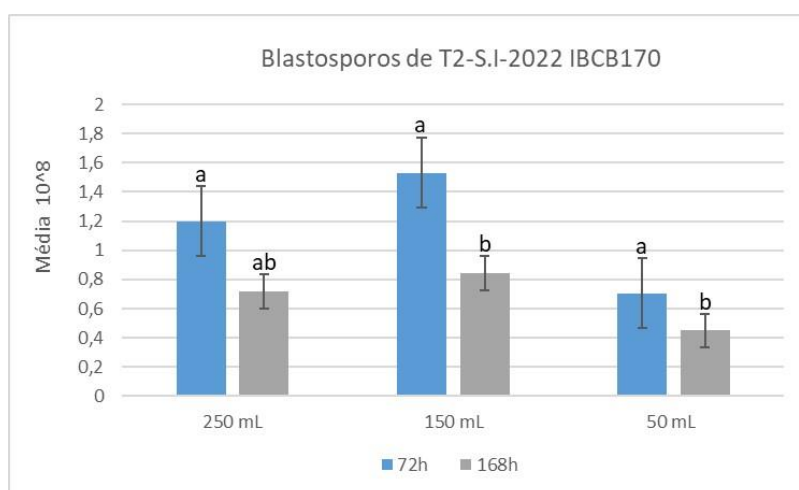


Figura 82 – Média de concentração de blastosporos de IBCB170 com o inóculo T2 da seleção S.I-2022 em relação ao tempo e ao volume após aplicação do teste Tukey ($p > 0,05$).

Em relação às unidades formadoras de colônias (UFC), as médias obtidas para inóculo T2.S.I-2022 de IBCB 170 foram maiores para o volume de 150 mL no tempo de 72h com 254 colônias (Tabela 32).

Tabela 32 – Médias de UFC para inóculo *T2.S.I-2022 de IBCB170, em relação ao tempo e ao volume

Volume de inóculo	Tempo	pH	Temperatura ° C	UFC 10 ⁸
250 mL	72h	4,50	26	181
	168h	4,81	26	111
150 mL	72h	4,47	27	254
	168h	5,04	27	195
50 mL	72h	4,55	27,5	162
	168h	5,53	27,5	87

*T2 = tratamento2 da seleção S.I-2022: S= Seleção; I= um; 2022= ano do desenvolvimento

Para os experimentos I, II e III realizados em biorreator de bancada com o inóculo T4.S.I-2022 de IBCB383, a média de concentração de blastosporos/mL em 72h foi maior do que para 168h. Em relação ao volume, maior média de concentração foi para 250mL de inóculo com 1,18 blastosporos/mL (Figura 83).

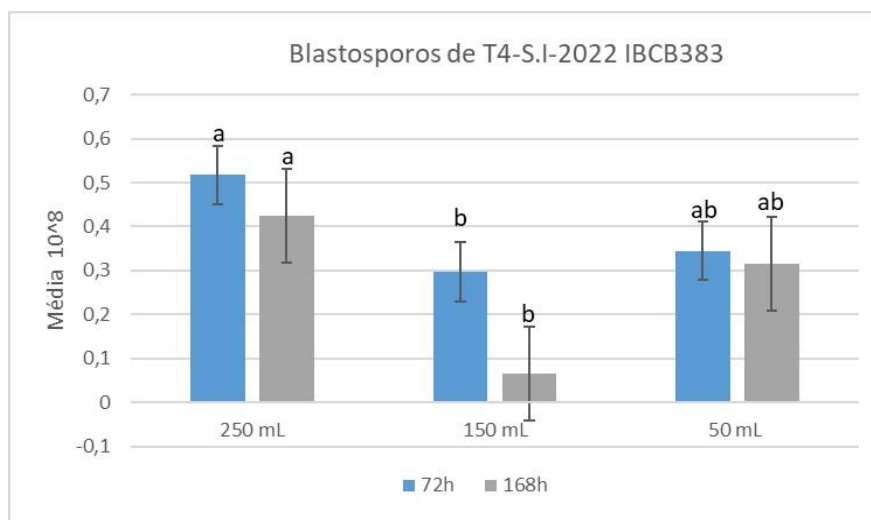


Figura 83 – Média de concentração de blastosporos de IBCB383 com o inóculo T4 da seleção S.I-2022 em relação ao tempo e ao volume após aplicação do teste Tukey ($p > 0,05$).

Em relação às unidades formadoras de colônias (UFC), as médias obtidas para inóculo T4.S.I-2023 de IBCB383 foram maiores para o volume de 250 mL no tempo de 72h com 78,5 colônias (Tabela 33).

Tabela 33 – Médias de UFC para inóculo *T4.S.I-2022 de IBCB383, em relação ao tempo e ao volume

Volume de inóculo	Tempo	pH	Temperatura ° C	UFC 10 ⁸
250 mL	72h	4,36	26,5	78,5
	168h	4,55	26	42
150 mL	72h	4,76	27	61
	168h	4,35	27	17
50 mL	72h	4,56	27	58
	168h	4,50	27	56

*T4 = tratamento 4 da seleção S.I-2022: S= Seleção; I= um; 2022= ano do desenvolvimento

Para os experimentos I e II realizados em biorreator de bancada com o inóculo T2.S.II-2023 de IBCB170, a média de concentração de blastosporos/mL foi maior para o volume de 150 mL (Figura 84).

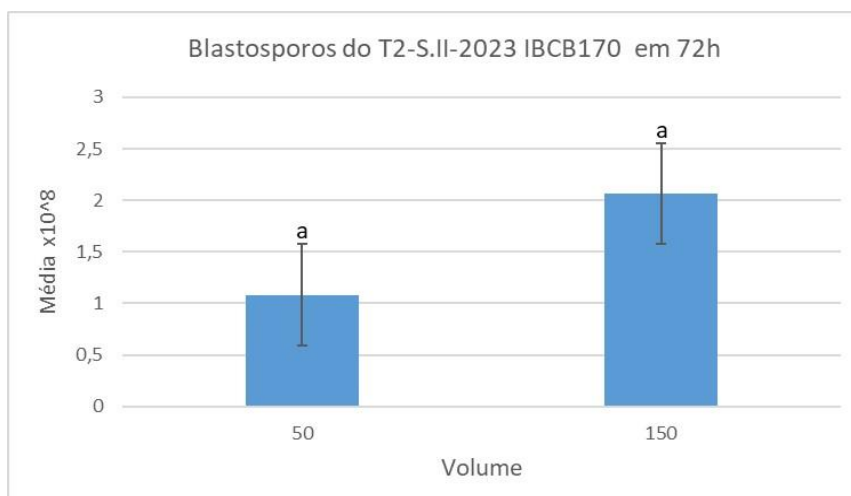


Figura 84 – Média de concentração de blastosporos de IBCB170 com o inóculo T2 da seleção S.II-2023 em relação ao volume após aplicação do teste Tukey ($p > 0,05$).

Em relação às unidades formadoras de colônias (UFC), as médias obtidas para inóculo T2.S.II-2023 de IBCB 170 foram maiores para o volume de 150 mL no tempo de 72h com 254 colônias (Tabela 34).

Tabela 34 – Médias de UFC para inóculo *T2.S.II-2023 de IBCB170, em relação ao tempo e ao volume

Volume de inóculo	Tempo	pH	Temperatura ° C	UFC 10 ⁸
150 mL	72h	4,43	27	284
50 mL	72h	4,38	27	198

*T2 = tratamento2 da seleção S.II-2023; S= Seleção; II= dois; 2023= ano do desenvolvimento

Para os experimentos I e II realizados em biorreator de bancada com o inóculo T1.S.II-2023 de IBCB383, a média de concentração de blastosporos/mL em 72h foi maior para o volume de 150 mL de inóculo (Figura 85).

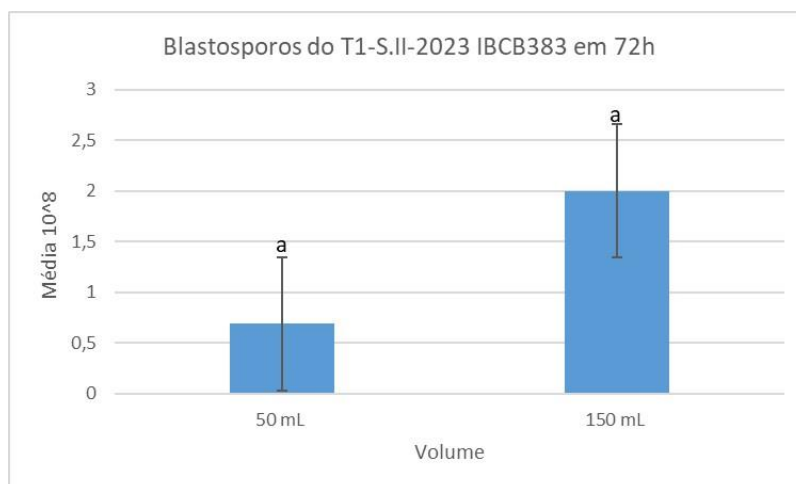


Figura 85 – Média de concentração de blastosporos de IBCB383 com o inóculo T1 da seleção S.II-2023 em relação ao volume após aplicação do teste Tukey ($p > 0,05$).

Em relação às unidades formadoras de colônias (UFC), as médias obtidas para inóculo T2.S.II-2023 de IBCB 170 foram maiores para o volume de 150 mL no tempo de 72h com 254 colônias (Tabela 35).

Tabela 35 – Médias de UFC para inóculo *T2.S.II-2023 de IBCB383, em relação ao tempo e ao volume

Volume de inóculo	Tempo	pH	Temperatura ° C	UFC 10 ⁸
150 mL	72h	4,33	27	84
50 mL	72h	4,48	26,5	58

*T2 = tratamento2 da seleção S.II-2023: S= Seleção; II= um; 2023= ano do desenvolvimento

16. DISCUSSÃO

16.1 Seleção nutricional para meio de cultura para IBCB170 e IBCB 383 em Erlenmeyers

Nos experimentos para seleção dos meios em Erlenmeyer, não foram controlados pH e temperatura, de maneira que, a modulação do fungo ocorreu de maneira natural tanto para S.I-2022 quanto para S.II-2023. No entanto, deve-se pontuar que na sala onde estava a mesa orbital a temperatura oscilou entre 27 e 33,8° C, o que pode ter interferido na produção geral das estruturas fúngicas.

O uso de fontes de nitrogênio, como nitrato de amônio e sulfato de amônio, pode alterar o pH do meio de cultivo devido à liberação de íons durante o metabolismo microbiano (Magasanik; Kaiser, 2002). Além disso, a escolha da fonte de carbono, como glicose ou sacarose, pode influenciar a produção de ácidos orgânicos, afetando o pH do meio e a eficiência do cultivo de fungos filamentosos (Mascarin et al., 2015). Também, a escolha da fonte de carbono, como glicose ou sacarose, influencia diretamente a produção de ácidos orgânicos que podem acidificar o meio (Alterthum et al., 2021). Em nossos resultados, os experimentos demonstraram que a quantidade de blastosporos/mL varia conforme a composição do meio de cultivo, especialmente nas variações das fontes de carbono e nitrogênio. Em estudos de Leite et al. (2003) foram observados que fungos dos gêneros *Batkoa* sp., *Furia* sp. e *Neozygites* sp. respondem de maneira semelhante a diferentes fontes de carbono, mas variam quanto às de nitrogênio. Já Vega et al. (2003) analisaram e confirmaram diferenças dos efeitos da composição de nutrientes para a produção de blastosporos de *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosorosea* e *Metarhizium anisopliae* e constataram que os maiores rendimentos de esporos foram obtidos para o isolado de *P. fumosorosea* 6,9 a 9,7 x10⁸ blastosporos/mL, para *B. bassiana* 12,2x10⁸ blastosporos/mL e o isolado *M. anisopliae* com menor produção em todas as condições testadas. Esses resultados corroboram com os deste trabalho, no qual a produção de blastosporos do fungo *M. anisopliae* também se apresentou menor em relação aos resultados de *B. bassiana*.

Para a seleção S.I-2022 para a IBCB170, o tratamento T2 apresentou um pH de 3,71, obteve o melhor desempenho em termos de concentração de blastosporos/mL 5,65x10⁸, sugerindo que a adição de nitrato de amônio favoreceu não apenas o crescimento celular, mas também a formação de blastosporos. Além disso, o nitrato de amônio (NH₄NO₃) que contém 32% de nitrogênio na sua composição, sendo metade do nitrogênio na forma de nitrato, e metade na forma de amônia pode fornecer uma fonte eficaz de nitrogênio para a produção de proteínas e outras moléculas essenciais à fisiologia do fungo, favorecendo sua reprodução (Schmidell; Zanfonato, 2021).

Por outro lado, o T3 também apresentou um pH baixo 2,37 e uma boa produção de blastosporos/mL 5,12x10⁸, o que indica que o sulfato de amônio pode ser uma

alternativa eficaz ao nitrato de amônio, embora com um rendimento ligeiramente inferior. Ainda, o pH ácido no T3 pode ter favorecido uma maior disponibilidade de íons amônio para as células fúngicas, mas talvez tenha limitado a produção em relação ao nitrato de amônio devido a fatores como toxicidade ou alteração no metabolismo fúngico (Magasanik; Kaiser, 2002).

O tratamento T4 apresentou pH de 3,88 e concentração de blastosporos menor $3,03 \times 10^8$ em comparação com o nitrato de amônio isolado (T2). Isso pode indicar que, embora o extrato de levedura adicione nutrientes essenciais, ele não favoreceu a produção de blastosporos de maneira tão eficiente quanto o nitrato de amônio sozinho. O extrato de levedura pode fornecer elementos que favorecem o crescimento, mas sua eficácia parece ser limitada em comparação com a fonte de nitrogênio mais simples e direta fornecida pelo nitrato de amônio.

O tratamento T1 apresentou o menor rendimento de blastosporos/mL 1,16, o que sugere que o extrato de levedura sozinho, apesar de seu alto valor nutricional, não é suficiente para maximizar a produção de blastosporos, principalmente quando comparado com outras fontes de nitrogênio mais específicas, como o nitrato ou sulfato de amônio.

O tratamento T5 apresentou um pH de 3,68 e uma concentração de blastosporos de 2,68, que foi a segunda menor entre os tratamentos. Apesar do pH ácido, que poderia favorecer a produção de blastosporos, a combinação do extrato de levedura com sulfato de amônio não gerou um resultado tão expressivo quanto o nitrato de amônio (T2) e o sulfato de amônio isolado (T3). Isso pode significar que a combinação desses nutrientes não necessariamente é sinérgica neste caso específico.

Portanto, os resultados obtidos na seleção S.I-2022 para a cepa IBCB170, tanto nitrato quanto sulfato de amônio, e a combinação de demonstraram ser fontes de nutrição mais eficiente para a produção de blastosporos sugerindo que um pH mais baixo e a combinação das fontes de nitrogênio adequadas são fatores determinantes na otimização da produção de blastosporos.

Para a seleção S.I-2022 com a cepa IBCB383, o tratamento T1 apresentou média de pH de 4,97 e concentração de $4,03 \times 10^8$ blastosporos/mL, o T1 apresentou uma concentração relativamente baixa em comparação com os demais tratamentos, o que sugere que o extrato de levedura isolado, sem vitaminas, forneceu nutrientes limitados para a produção de blastosporos. O pH mais neutro também pode ter desfavorecido a produção, já que valores mais ácidos frequentemente promovem a esporulação.

No tratamento T2, o pH foi mais ácido, 1,07, e a concentração de blastosporos foi de $6,06 \times 10^8$. Isso indica que o nitrato de amônio isolado, apesar de propiciar um ambiente ácido, talvez não forneça nutrientes suficientes para otimizar a esporulação nesta condição.

O tratamento T3 apresentou pH de 2,06 e concentração de $7,56 \times 10^8$ blastosporos/mL, apresentando um desempenho melhor que o T2. Este resultado sugere que, para a cepa IBCB383, o sulfato de amônio foi mais eficaz como fonte de nitrogênio do que o nitrato de amônio. Além disso, o pH ácido e a possível liberação gradual de amônio pelo sulfato podem ter favorecido um ambiente mais propício para a produção de blastosporos.

Para o tratamento T4, o pH foi de 3,43, e a maior concentração de blastosporos entre os tratamentos foi atingida, com $16,15 \times 10^8$ blastosporos/mL. A combinação do extrato de levedura com o nitrato de amônio parece ter criado um meio nutritivo mais adequado para a cepa IBCB383, o que resultou em uma melhor produção de blastosporos. O pH também tendia à acidez, o que pode ter contribuído para um ambiente favorável à produção de blastosporos.

O tratamento T5 apresentou pH de 3,35 e concentração de $14,31 \times 10^8$ blastosporos/mL, sendo o segundo mais eficaz na produção de blastosporos, próximo ao T4. A combinação de extrato de levedura e sulfato de amônio mostrou-se eficaz, embora um pouco menos eficiente do que o nitrato de amônio em combinação. Este resultado reforça a ideia de que o extrato de levedura, quando combinado com uma fonte de nitrogênio inorgânico, cria um meio mais completo, embora o sulfato de amônio não tenha sido tão eficaz quanto o nitrato.

Esses dados sugerem que, sem o complexo vitamínico, a combinação do extrato de levedura com uma fonte de nitrogênio mineral (especialmente o nitrato de amônio) fornece um meio mais balanceado para o crescimento e esporulação dos fungos, alcançando as concentrações mais altas de blastosporos. Os tratamentos que incluíram extrato de levedura (T4 e T5) destacaram-se por potencializar a concentração de blastosporos em comparação com os tratamentos que utilizaram fontes de nitrogênio isoladas (T2 e T3).

Para a cepa IBCB170 na seleção S.II-2023, o tratamento T1 apresentou pH de 3,42 e concentração de blastosporos/mL de $2,55 \times 10^8$. Isso indica que a acidez moderada parece favorecer a esporulação, com resultados superiores a outros tratamentos que também incluíram sacarose e nitrato de amônio, sugerindo uma boa interação entre os componentes.

O tratamento T2 apresentou pH de 4,05 e concentração de blastosporos de $2,57 \times 10^8$ /mL. Embora o pH tenha sido levemente mais alto que o do T1, a concentração de

blastosporos/mL foi muito próxima à do T1. Além disso, a presença do sulfato de amônio pode ter contribuído para uma modulação de pH favorável à produção de blastosporos.

Os tratamentos T3, T4 e T5 apresentaram baixíssimas concentrações de blastosporos: $0,05$, $0,05$ e $0,09 \times 10^8$ blastosporos, respectivamente, com variação do pH entre 5,29 e 6,00. A d-glicose anidra e o nitrato de amônio (T3 e T5) ou o extrato de levedura isolado (T4) proporcionaram um ambiente mais alcalino, o que pode ter desfavorecido o desenvolvimento dos blastosporos. Essa tendência sugere que a produção de blastosporos é mais eficiente em ambientes levemente ácidos.

O tratamento T6 apresentou pH de 6,17 e concentração de blastosporos/mL de $0,24 \times 10^8$ /mL. Embora esse tratamento incluía uma fonte orgânica de nitrogênio (peptona de soja), o pH elevado pode ter sido desfavorável, resultando em uma baixa produção de blastosporos. A sacarose e a peptona não conseguiram manter o pH em uma faixa ácida, o que foi desfavorável para o desenvolvimento de blastosporos.

O tratamento T7 apresentou pH de 6,19 e concentração de blastosporos de $1,25 \times 10^8$ /mL, sendo o pH mais elevado entre todos. Embora não muito alto, o rendimento das células blastospóricas foi um pouco superior aos demais tratamentos com pH neutro, sugerindo que a glicose, combinada com a peptona de soja e nitrato de amônio, oferece uma leve melhoria, ainda que abaixo do potencial de outros tratamentos.

O tratamento T8 apresentou pH de 5,11 e concentração de blastosporos de $2,09 \times 10^8$ /mL. Comparado aos demais tratamentos com d-glicose, a ausência de nitrato de amônio e a inclusão da peptona de soja indicam que essa combinação de nutrientes pode ser promissora na produção moderada de blastosporos, cabendo mais pesquisas para tal constatação.

Para a seleção S.II-2023 e cepa IBCB383, o tratamento T1 apresentou pH de 2,49 e concentração de $1,298 \times 10^8$ blastosporos/mL. Este tratamento apresentou o pH mais ácido dentre os tratamentos, o que pode ter sido favorável para a produção de blastosporos, resultando em uma das concentrações mais altas, $1,298 \times 10^8$ blastosporos/mL. A combinação de sacarose e sulfato de amônio, com a adição de extrato de levedura, demonstrou proporcionar uma condição mais adequada para o crescimento.

O tratamento T2 apresentou pH de 2,83 e concentração de blastosporos/mL de $0,002 \times 10^8$. No entanto, apesar do pH ácido, a concentração de blastosporos foi extremamente baixa. Isso pode indicar que a combinação de glicose com nitrato de amônio e extrato de levedura não foi eficiente para a produção das células blastospóricas, possivelmente devido à

interação entre esses componentes no momento da autoclavagem (Alterthum et al., 2021; Schmidell; Zanfonato, 2021).

O tratamento T3 apresentou pH de 5,36, com a concentração de blastosporos/mL em $0,027 \times 10^8$. O pH mais elevado neste tratamento pode ter afetado negativamente a produção de blastosporos, resultando em uma concentração de apenas $0,027 \times 10^8$ blastosporos/mL. O nitrato de amônio e o extrato de levedura, com a D-glicose anidra, não produziram um ambiente propício para a esporulação neste caso.

O tratamento T4 apresentou pH de 4,41 e concentração de blastosporos/mL em $0,044 \times 10^8$. Este tratamento, com pH moderado, também teve baixa produção de blastosporos, sugerindo que a ausência de uma fonte de nitrogênio inorgânico, como o nitrato ou sulfato de amônio, pode ter reduzido o potencial produtivo do meio para a cepa inoculada.

O tratamento T5 apresentou pH de 5,2 e concentração de blastosporos/mL em $0,008 \times 10^8$ blastosporos/mL. Com um pH mais alcalino, este tratamento resultou em uma produção muito baixa de blastosporos. A combinação de peptona de soja e nitrato de amônio com D-glicose anidra indica ineficiência para a produção de blastosporos para a cepa IBCB383.

O tratamento T6 apresentou pH de 3,94 com a concentração de blastosporos/mL em $0,001 \times 10^8$. Embora o pH obtido tenha sido relativamente ácido, a concentração de blastosporos foi a mais baixa entre todos os tratamentos. Isso mostra que a combinação de nitrato de amônio com peptona de soja e sacarose deste tratamento não foi propícia para a produção de blastosporos.

O tratamento T7 apresentou pH de 3,28 e concentração de blastosporos/mL em $0,077 \times 10^8$. Este tratamento apresentou uma concentração de blastosporos maior que os demais tratamentos com peptona de soja, mas ainda baixa, com $0,077 \times 10^8$ blastosporos/mL. A presença de nitrato de amônio e a glicose pode ter contribuído para essa leve melhora, mas ainda não foi suficiente para melhorar a produção das células blastospóricas.

O tratamento T8 apresentou pH de 4,91 e concentração de blastosporos/mL em $0,290 \times 10^8$. O pH pode ter contribuído para a produção ligeiramente superior de blastosporos em relação a outros tratamentos com peptona de soja. Isso sugere que a ausência de uma fonte de nitrogênio inorgânico parece limitar o potencial de produção de blastosporos.

A maioria dos tratamentos que apresentou pH ácido (T1, T2 e T7) conseguiu melhores concentrações de blastosporos comparados aos tratamentos com pH mais próximo de neutro (T5 e T6), indicando que a cepa IBCB383 pode preferir meios levemente ácidos para uma produção de blastosporos mais eficiente. Além disso, a interação entre as fontes de

carbono e nitrogênio pode ter contribuído para a modulação do pH e para a produção de blastosporos na cepa IBCB383. A sacarose com sulfato de amônio e extrato de levedura (T1) mostrou-se a mais eficaz, destacando-se como a combinação mais favorável para a produção de blastosporos. Esse resultado indica que a escolha de nutrientes que proporcionem um pH levemente ácido, associado à presença de fontes de nitrogênio inorgânico, pode ser uma estratégia promissora para otimizar a produção de blastosporos para a cepa em estudo.

Levando em consideração as concentrações das suspensões iniciais para os inóculos, que variaram neste trabalho entre 1×10^8 e 6×10^8 conídios aéreos/mL, em estudos de Gandarilla-Pacheco et al. (2017), a produção de unidades infecciosas (blastosporos) de *Isaria fumosorosea* registrou a concentração mais elevada de blastosporos obtida no cultivo submerso, atingindo a concentração de $4,90 \times 10^8$ blastosporos/mL no meio casaminoácidos. No meio com peptona de colágeno, obteve-se $2,15 \times 10^8$ blastosporos/mL, ambos inoculados com suspensão fúngica em 1×10^8 . Esses resultados sugerem que, apesar das concentrações obtidas, mais estudos são necessários para determinar os componentes e as quantidades para uma produção em larga escala que seja ao mesmo tempo produtiva e economicamente viável.

16.2 Experimentos com os inóculos da S.I-2022 e S.II-2023 para IBCB170 e IBCB383 em biorreator de bancada

Para os experimentos realizados com a S.I-2022 para IBCB170 em biorreator de bancada, observou-se que o tempo de incubação de 72 horas resultou em uma média de concentração de blastosporos/mL superior àquela observada em 168 horas. Isso sugere que, para o meio testado, o período mais curto de incubação pode ser mais eficaz para a proliferação inicial de blastosporos, possivelmente devido a um melhor aproveitamento dos nutrientes e condições metabólicas favoráveis, que começam a se esgotar com o tempo, impactando negativamente a taxa de produção em períodos mais longos (Alterthum, 2021; Schmidell, 2021).

Em termos de volume de inóculo, o maior rendimento foi observado em 150 mL, alcançando uma concentração média de $1,18 \times 10^8$ blastosporos/mL. Esse dado indica que um volume de 150 mL pode proporcionar uma densidade celular inicial e uma taxa de crescimento que favorecem a produção de blastosporos de forma mais eficiente em comparação a volumes menores ou maiores. Estudos sobre a fermentação submersa de fungos, como os de Mascarin e Jaronski (2016), mostram que o volume de inóculo impacta

diretamente o perfil de crescimento e a demanda por oxigênio. Em volumes menores, pode haver uma limitação de nutrientes disponíveis, enquanto volumes excessivamente grandes podem gerar estresse por competição e por fatores como acumulação de metabólitos tóxicos.

Em relação à viabilidade dos blastosporos, medida por unidades formadoras de colônias (UFC), a maior média de colônias (254) foi alcançada para o inóculo de 150 mL em 72 horas. Isso demonstra que, além da melhor concentração de blastosporos, o inóculo neste volume também manteve a viabilidade celular em níveis mais elevados. O valor de UFC corrobora com os resultados de tempo e volume, servindo como um indicador de viabilidade, sugerindo que o tempo de incubação de 72 horas com o volume de 150 mL permite a manutenção de blastosporos viáveis em níveis mais elevados.

Ainda, esses resultados estão alinhados com a teoria da fermentação líquida submersa, na qual a fase de crescimento logarítmico inicial (primeiras 72 horas) é a fase ideal para a produção de blastosporos viáveis e em alta concentração, antes da entrada na fase estacionária, onde o consumo de nutrientes e a acumulação de metabólitos secundários podem limitar o crescimento (Alterthum et al., 2021; Schmidell; Zanfonato, 2021).

De acordo com os estudos de Mascarin et al. (2015), os melhores resultados de produção de blastosporos ocorreram quando o volume de inóculo foi ajustado para 5% (v/v), com uma temperatura de cultivo de 27°C. Em relação ao oxigênio dissolvido, Jackson et al. (2014) observaram que a manutenção de 20% de oxigênio dissolvido no meio de fermentação resultou em uma produção de blastosporos mais eficaz, com a produção máxima de blastosporos também obtida durante a fase logarítmica inicial, com concentrações superiores a $1,5 \times 10^8$ blastosporos/mL. Esses autores destacam a importância de monitorar os níveis de pH e a oxigenação que, associadas ao volume de inóculo e o tempo de fermentação, maximizam a produção de células blastospóricas.

Para os experimentos realizados em biorreator de bancada com o inóculo T4.S.I-2022 da cepa IBCB383, foi observada uma média de concentração de blastosporos/mL significativamente maior após 72 horas de incubação em comparação com 168 horas. Isso indica que o crescimento inicial do fungo, que já vem dos inóculos, é mais eficaz em um período mais curto, com uma maior produção de blastosporos no início da fermentação. Esse comportamento pode ser explicado pela fase de crescimento logarítmico, onde o fungo tem acesso a uma maior quantidade de nutrientes disponíveis, promovendo a proliferação celular de blastosporos antes que o meio comece a se esgotar, o que pode ocorrer em tempos mais longos (Alterthum et al., 2021; Schmidell; Zanfonato, 2021).

Quanto ao volume de inóculo, para a cepa IBCB383 o maior rendimento foi também registrado para 150 mL, com uma média de $1,18 \times 10^8$ blastosporos/mL. Isso sugere que esse volume proporcionou uma densidade de células no início do processo, o que favoreceu o crescimento eficiente dos blastosporos. Esses resultados podem indicar que a fermentação líquida submersa com volumes de inóculo menores que 10% do meio pode oferecer uma quantidade suficiente de células para alcançar uma boa concentração de blastosporos, enquanto volumes maiores podem resultar em condições desfavoráveis, como competição por nutrientes e oxigênio, levando a um crescimento subótimo e redução na produção de blastosporos. Isso está de acordo com estudos anteriores de Mascarin e Jaronski (2016), que indicam que o volume de inóculo é um dos principais fatores que impacta a produção de blastosporos. Os autores discutem ainda o volume de inóculo como fator que afeta diretamente a densidade celular e o acesso a recursos no meio, impactando a eficiência de crescimento e a morfologia dos propágulos formados.

Em relação à viabilidade celular, medida pelas unidades formadoras de colônias (UFC), as maiores médias (78,5 colônias) foram obtidas para o inóculo T4.S.I-2022 de IBCB383 com 250 mL no tempo de 72 horas. Este volume parece ser ideal para manter um número maior de células viáveis ao longo do tempo de incubação, o que pode ser devido à maior quantidade de nutrientes disponíveis para as células do fungo nesse volume. Também indica que, para a cepa testada, um volume maior de inóculo pode favorecer o crescimento e a manutenção de blastosporos viáveis. A relação volume:UFC também corrobora a ideia de que volumes maiores podem resultar em melhores condições de crescimento, até certo ponto, sem comprometer a qualidade da viabilidade celular. Em estudos de Jackson e Jaronski (2012) e Jackson e Mascarin (2015), foi constatado que o controle do volume de inóculo e o tempo de fermentação são fatores críticos para a otimização da produção e viabilidade de blastosporos em fermentação líquida submersa. Esses parâmetros influenciam diretamente a taxa de crescimento celular, a eficiência no uso dos nutrientes e a tolerância à dessecação dos propágulos formados. Jackson e Jaronski (2012) observaram que o uso de volumes de inóculo na faixa de 1×10^6 a 1×10^8 células blastospóricas/mL foi ideal para maximizar a produção de blastosporos de *Isaria fumosorosea*, enquanto o tempo de fermentação de 72 horas apresentou o melhor equilíbrio entre concentração celular e viabilidade. De maneira similar, Jackson e Mascarin (2015) destacaram que a taxa de produção de blastosporos em *Beauveria bassiana* alcançou valores de até $1,5 \times 10^{10}$ células blastospóricas/mL em condições otimizadas, com ajustes de pH e aeração. Isso indica que o sucesso na produção de blastosporos depende de uma abordagem integrada, onde variáveis como composição do meio, volume de inóculo e

parâmetros ambientais, como os níveis de oxigênio dissolvido, são monitorados e ajustados de maneira sinérgica (Alterthum et al., 2021; Schmidell; Zanfonato, 2021). Esses resultados corroboram com o desta pesquisa, pois o volume de inóculo de 150 mL mostrou ser ideal para a maior produção de blastosporos/mL, enquanto o volume de 250 mL demonstrou um bom desempenho na manutenção da viabilidade celular, medida pelas UFC. Além disso, esses resultados indicam que, enquanto os períodos mais curtos de incubação favorecem a concentração de blastosporos, volumes maiores, como 250 mL, favorecem a viabilidade dos blastosporos, o que é fundamental para aplicações biotecnológicas como o controle biológico de pragas.

Nos experimentos I e II realizados em biorreator de bancada com o inóculo T2.S.II-2023 da cepa IBCB170, os resultados mostraram que a média de concentração de blastosporos/mL foi maior para o volume de 150 mL, indicando que este volume de inóculo favoreceu a produção de blastosporos em comparação com outros volumes testados. Esse comportamento sugere que a quantidade de substrato e a densidade celular inicial proporcionada pelo volume de 150 mL são ideais para otimizar o crescimento do fungo, principalmente nas primeiras horas de fermentação, onde a disponibilidade de nutrientes e oxigênio desempenha um papel crucial no desenvolvimento celular (Jackson; Jaronski, 2012; Jackson; Mascarin, 2015; Alterthum, et al., 2021).

No caso específico do volume de 150 mL, a produção de blastosporos foi superior devido a uma maior disponibilidade de espaço e nutrientes, permitindo que o fungo tivesse condições favoráveis para a proliferação celular. Esse volume de inóculo pode ter promovido uma dinâmica de crescimento mais eficiente, sem que a competição por recursos entre as células se tornasse um fator limitante, o que pode ocorrer com volumes de inóculo maiores ou menores.

Em relação à viabilidade celular, medida pelas unidades formadoras de colônias (UFC), as médias obtidas para o inóculo T2.S.II-2023 de IBCB170 foram também mais altas para o volume de 150 mL no tempo de 72 horas, com uma média de 254 colônias. Isso sugere que, além de promover uma maior concentração de blastosporos, o volume de 150 mL favoreceu a viabilidade dos blastosporos, mantendo uma maior quantidade de células viáveis capazes de formar colônias após a incubação. A maior produção de UFC pode ser vista como um reflexo da condição ideal de fermentação para o meio testado. O controle de parâmetros como o volume de inóculo, a disponibilidade de nutrientes e o tempo de incubação são fundamentais para otimizar a produção de blastosporos. Isso corrobora com o que é relatado por Tonso et al. (2009), que destacam a importância do equilíbrio entre volume de inóculo e

as condições de cultivo para maximizar a produção e a viabilidade de blastosporos em sistemas de fermentação líquida submersa.

Nos experimentos I e II realizados em biorreator de bancada com o inóculo T1.S.II-2023 para a cepa IBCB383, os resultados indicaram que a média de concentração de blastosporos/mL também foi maior para o volume de 150 mL após 72 horas. Esse comportamento é esperado em fermentação líquida submersa, pois como já citado anteriormente, trabalhos de Jackson e Jaronski (2012) e Jackson e Mascarin (2015), o volume de inóculo pode proporcionar melhores condições para o crescimento do fungo. Isso sugere que os resultados desta pesquisa para o volume de 150 mL, há uma distribuição equilibrada de nutrientes e oxigênio, favorecendo a proliferação do fungo sem que haja limitações significativas no processo, como a competição excessiva por recursos. Esse volume também pode ter contribuído para um maior metabolismo do fungo, resultando em uma concentração mais alta de blastosporos. Mascarin e Jaronski (2016) enfatizaram que o volume de inóculo e o controle de variáveis como aeração e tempo de fermentação são determinantes na produção de blastosporos de fungos entomopatogênicos. Embora o volume de 150 mL não seja citado diretamente, os autores discutem que ajustes no volume de inóculo podem otimizar o contato com nutrientes e favorecer a produção celular. Esses fatores, aliados a práticas como manutenção de condições específicas de pH e aeração, impactam diretamente a taxa de crescimento e a viabilidade dos propágulos produzidos.

A maior produção de blastosporos e UFC observada para o volume de 150 mL no inóculo T1.S.II-2023 de IBCB383 sugere que esse volume de inóculo favoreceu tanto a taxa de crescimento celular quanto a viabilidade dos blastosporos, corroborando o efeito positivo do volume de inóculo para otimizar tanto a produção de blastosporos quanto a viabilidade celular. Esses achados reforçam os resultados de Jackson et al. (2014), que destacaram a importância do volume de inóculo na produção de blastosporos, enquanto Tonso et al. (2009) sugerem que o controle do tempo de fermentação é igualmente importante para maximizar a viabilidade da cepa testada.

O volume de 150 mL dos meios testados neste estudo mostrou-se ser um ponto de equilíbrio entre a produção ótima de blastosporos e a viabilidade das células, o que é importante para o sucesso de futuras aplicações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* como bioproduto de fermentação líquida para o controle de pragas.

Dessa forma, esta pesquisa colaborou com informações importantes para obtenção de maior número de células blastospóricas em meio líquido com diferentes composições nutricionais, o que mostra a necessidade e importância de continuidade nas pesquisas.

17. CONCLUSÕES

- Nos testes em Erlenmeyers, a maior concentração de blastosporos/mL foi observada para a cepa IBCB170, tanto para a seleção S.I-2022 ($5,65 \times 10^8$) quanto para a seleção S.II-2023 ($2,57 \times 10^8$).
- É importante a continuidade das pesquisas sobre a interação entre os nutrientes e a modulação do pH para otimização da produção de blastosporos em Erlenmeyers.
- O inóculo da seleção S.I-2022 para a cepa IBCB170, testado em biorreator de bancada no tempo de fermentação de 72 horas, resultou em uma média de concentração de blastosporos/mL superior àquela observada em 168 horas.
- A viabilidade celular do meio T2 da seleção S.I-2022 em biorreator de bancada, medida pelas unidades formadoras de colônias (UFC), foi mais alta para o volume de 150 mL no tempo de 72 horas.

18. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT, Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Consulta de pragas, doenças e produtos indicados**. Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 18 jul. 2024.

ALTERTHUM, F. et al. *Biotecnologia Industrial*. **Fundamentos**, v. 1, 2.ed., p. 15- 51, 2021.

ALVES, R. T.; FARIA, M. Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos. **Planaltina (DF), Embrapa Cerrados**, p. 26-31, 2010.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**, 2.ed. Piracicaba: Fealq, 1998. p.289-381.

BASSO, Vanessa et al. High concentration of spores and colony forming units of the biocontrol agent *Beauveria bassiana* via optimization of submerged cultivation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 47, p. 102607, 2023.

CARVALHO, A. L. de A. et al. Optimizing the mass production of *Clonostachys rosea* by liquid-state fermentation. **Biological control**, v. 118, p. 16-25, 2018.

COJANU, D.; LUMÎNARE, C. M. Effect of different carbon and nitrogen sources on sporulation of *Beauveria bassiana* Romanian strains. **Romanian Journal for Plant Protection**, v. 11, p. 24-31, 2021.

DE SÁ SANTOS, P. et al. (2021) Nutritional impact of low-cost substrates on biphasic fermentation for conidia production of the fungal biopesticide *Metarhizium anisopliae*. **Bioresource Technology Reports**, v. 13, p. 100619, 2021.

GANDARILLA-PACHECO, F. L. et al., (2017) Production of infectious units of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) from different indigenous isolates of northeastern Mexico using 3 propagation strategies. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 50, n. 1, p. 81-89, 2017.

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

JACKSON, M. A.; DUNLAP, C. A.; JARONSKI, S. T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **BioControl**, v. 55, p. 129-145, 2010.

JACKSON M. A.; JARONSKI S. T. (2012) Desenvolvimento de processos de fermentação e estabilização em escala piloto para a produção de microescleródios do fungo entomopatogênico *Metarhizium brunneum* cepa F52. **Biocontrol Sci Tech** 22(8):915–930.

LEITE, L. G., et al., (2003). Efeito de sais, vitaminas, açúcares e fontes de nitrogênio no crescimento de três gêneros de Entomophthorales: Batkoa, Furia e Neozygites. **Mycological Research**, 107, 872-878.

LI, Z. et al. (2010) Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, n. 2, p. 117-136, 2010. DOI: 10.1080/09583150903431665

MAGASANIK, B.; KAISER, C. A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 290, n. 1-2, p. 1-18, 2002.

MASCARIN, G. M. et al., (2024) Advances in submerged liquid fermentation and formulation of entomopathogenic fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 1-20, 2024.

MASCARIN, G. M., et al., (2019). Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of invertebrate pathology**, 165, 46-53.

MASCARIN, G. M. et al., (2018), Phenotype responses to abiotic stresses, asexual reproduction and virulence among isolates of the entomopathogenic fungus *Cordyceps javanica* (Hypocreales: Cordycipitaceae). **Microbiological research**, v. 216, p. 12-22, 2018.

MASCARIN, Gabriel Moura et al. Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and bioefficacy of blastospores. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, p. 6653-6665, 2015.

MASCARIN, G. M. et al., (2014) Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 30, p. 1583-1590.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 1-26, 2016.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical , Engineering journal**, v. 13, n. 2-3, p.81-84, 2003.

PARRA, J. R. P., **Situação do Controle Biológico no Brasil**. Disponível em: http://www.fapesp.br/eventos/2016/02/cb/Jose_Roberto.pdf.>. Acesso em: 22 jun. 2018.

PARVEEN, S. S.; JEYARANI, S.; JAYAPRADHA, C. Growth, Sporulation, and Biomass Production of Entomopathogenic Fungal Isolates in Different Culture Media. **Biopesticides International**, v. 17, n. 1, 2021.

PIGNATI, W. A. et al., Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 3281-3293, 2017.

ROSWANJAYA, Y. P.; SARYANAH, N. A.; DEVY, L. Conidia Production of *Beauveria Bassiana* in Solid Substrate Fermentation Using a Biphasic System. **KnE Life Sciences**, p. 648–663-648–663, 2022.

SCHMIDELL, W., ZANFONATO, K., *In*: Willibaldo et al. **Biotecnologia industrial-vol. 2: Engenharia bioquímica**. Editora Blucher, 2.ed. p. 06 – 90 , 2021.

TONSO, et al., Tipos de biorreatores e formas de operação. **Biotecnologia Industrial: engenharia bioquímica**, v. 2, p. 109-126, 2021.

VEGA, F. E., et al., (2003) The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. **World journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 363-368, 2003. doi:10.1023/ A:1023924304456.

YOUSEF-YOUSEF, M. et al., Produção de Microsclerotia por *Metarhizium* sp., e Fatores que Afetam Sua Sobrevivência, Germinação e Rendimento Conidial. **J. Fungos** **2022**, 8, 402. <https://doi.org/10.3390/jof8040402>

CAPÍTULO III

USO DE BLASTOSPOROS DE *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* PRODUZIDOS EM DE MEIO DE CULTURA LÍQUIDO PARA O CONTROLE DE *Sphenophorus levis* EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E CAMPO DE CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO

Nos últimos anos, o controle biológico de pragas na agricultura, com a utilização de microrganismos, tem tido maior adesão, com destaque para o uso de bioinseticidas. O objetivo deste trabalho foi testar o potencial infectivo de novos meios de cultura com blastosporos dos fungos *Beauveria bassiana* IBCB170 e *Metarhizium anisopliae* IBCB383 em adultos de *Sphenophorus levis*, em laboratório e campo. Em laboratório, foram realizados quatro experimentos de patogenicidade com adultos de *S. levis*, sendo um experimento para cada cepa e para cada seleção de meio (S.I-2022 e S.II-2023). Todos os experimentos tiveram o mesmo delineamento: cinco tratamentos, incluindo a testemunha, com cinco repetições e cinco besouros adultos em cada unidade experimental. O método de aplicação foi por imersão, com 1 mL de cada tratamento por 60 segundos. Foram feitas avaliações de mortalidade por sete dias, e os insetos mortos foram colocados em câmara úmida e acondicionados em câmara tipo BOD por até sete dias. Em campo, o experimento foi realizado na Fazenda Boa Esperança, município de Sertãozinho, São Paulo. No experimento, foram utilizados fermentados com os meios selecionados para IBCB170 e IBCB383 da seleção S.I-2022 na concentração de 1×10^8 , e suspensões com conídios aéreos, todos na concentração de 1×10^{13} . Foram cinco tratamentos, incluindo a testemunha, aplicados por pulverização em blocos casualizados entre os talhões 78 e 79, com posterior avaliação de tocos atacados. Aos resultados foram aplicados ANOVA e teste Tukey ($p < 0,05$) para os experimentos de laboratório, e teste Duncan para campo, por meio do software RStudio®. Nos resultados de laboratório, as maiores médias de mortalidade para S.I-2022 foram: para T2-IBCB170 T5, com 2,14, e para T4-IBCB383 T5, com 1,2. Para S.II-2023, as maiores médias foram: para T2-IBCB170 T2, com 5,0, e para T1-IBCB383, com 3,2. Em campo, a menor incidência de tocos atacados foi para o tratamento com blastosporos de *M. anisopliae* IBCB383, com média de 1 toco atacado.

Palavras-chave: controle biológico. fermentados infectivos. patogenicidade. bioinseticidas

ABSTRACT

In recent years, biological control of pests in agriculture, using microorganisms, has gained more acceptance, with an emphasis on the use of bioinsecticides. The aim of this study was to test the infective potential of new culture media with blastospores of the fungi *Beauveria bassiana* IBCB170 and *Metarhizium anisopliae* IBCB383 on adult *Sphenophorus levis*, both in the laboratory and in the field. In the laboratory, four pathogenicity experiments were conducted with adult *S. levis*, one experiment for each strain and each medium selection (S.I-2022 and S.II-2023). All experiments followed the same design: five treatments, including the control, with five repetitions and five adult beetles in each experimental unit. The application method was by immersion, with 1 mL of each treatment for 60 seconds. Mortality assessments were made over seven days, and the dead insects were placed in a humid chamber and stored in a BOD-type chamber for up to seven days. In the field, the experiment was conducted at Fazenda Boa Esperança, located in the municipality of Sertãozinho, São Paulo. In the experiment, fermentates with the selected media for IBCB170 and IBCB383 from selection S.I-2022 at a concentration of 1×10^8 , and suspensions with aerial conidia, all at a concentration of 1×10^{13} , were used. Five treatments, including the control, were applied by spraying in randomized blocks between plots 78 and 79, followed by the evaluation of attacked stumps. ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$) were applied to the laboratory experiments, and Duncan's test was applied to the field data using the RStudio® software. In the laboratory results, the highest average mortality rates for S.I-2022 were: for T2-IBCB170 T5, with 2.14, and for T4-IBCB383 T5, with 1.2. For S.II-2023, the highest averages were: for T2-IBCB170 T2, with 5.0, and for T1-IBCB383, with 3.2. In the field, the lowest incidence of attacked stumps was observed in the treatment with *M. anisopliae* IBCB383 blastospores, with an average of 1 attacked stump.

Keywords: biological control. infective fermentates. pathogenicity. bioinsecticides

19. INTRODUÇÃO

No Estado de São Paulo, maior produtor de cana-de-açúcar do Brasil, o setor canavieiro passou por uma transição na metodologia de colheita da cana (Conab, 2024; Única, 2024). Com a Lei Estadual nº 11.241/2002, o Estado passou a adotar a colheita da cana crua em substituição à cana queimada, que foi proibida, tornando o processo mecanizado (Ribeiro; Ficarelli, 2010; Dinardo-Miranda; Fracasso, 2013).

Com essas mudanças nos processos de colheita e na expansão das áreas de plantio, as condições comuns nas lavouras, em que a palhada permanece por mais tempo no solo, têm contribuído para o aumento proporcional de problemas relacionados às pragas, tornando seu controle uma prioridade do setor canavieiro (Almeida, 2005; Dinardo-Miranda, 2014; Brilhante et al., 2022).

Mais conhecido como bicudo-da-cana-de-açúcar ou gorgulho-da-cana, o besouro *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae), é considerado uma das pragas que mais causam prejuízos aos produtores, pois suas larvas atacam a planta em fase de brotação, provocando lesões e perdas econômicas que podem chegar a até 25 toneladas por hectare ao ano (Precetti; Arrigoni, 1990). Conforme Vaurie (1978), os registros de ocorrência dessa espécie no Brasil foram catalogados no ano de 1978 em Curitiba, PR, sendo registrada na região de Piracicaba, São Paulo, no ano de 1983.

Atualmente, as mudanças nos processos de colheita, a expansão das áreas para o plantio e o favorecimento de condições ambientais (palhada por mais tempo no solo) têm contribuído para o aumento proporcional de problemas relacionados às pragas, tornando seu controle uma prioridade do setor canavieiro (Almeida, 2005; Dinardo-Miranda, 2014; Brilhante et al., 2022).

São consideradas as principais pragas associadas à cultura da cana-de-açúcar: a broca-da-cana *Diatraea saccharalis*, a broca-gigante *Telchin licus*, a cigarrinha-das-raízes *Mahanarva fimbriolata*, o besouro-da-raiz-da-cana-de-açúcar *Migdolus fryanus* e o bicudo-da-cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis*, que ainda é considerado uma das principais pragas de solo na cultura da cana-de-açúcar (Botelho; Macedo, 2002; Villas Boas; Alves, 1988; Almeida; Batista-Filho, 2006; Garcia; Botelho, 2016).

Na tentativa de controlar *S. levis*, que é uma praga holometábola e edáfica de difícil controle, os produtores frequentemente recorrem ao uso de pesticidas sintéticos, incluindo inseticidas e nematicidas. Estes produtos químicos apresentam eficácia imediata no combate à praga, porém, seu uso excessivo e inadequado pode resultar em diversos impactos

negativos ao meio ambiente, como contaminação do solo e dos recursos hídricos, além do desenvolvimento de resistência por parte dos insetos-alvo (Parra, 2002; Silva et al., 2012).

Uma alternativa promissora ao uso de pesticidas sintéticos é o controle biológico, que envolve a introdução ou promoção de organismos naturais que atuam como agentes de controle de pragas (Alves et al., 2008). Nesse contexto, os fungos entomopatogênicos, como *B. bassiana* e *M. anisopliae*, destacam-se como potenciais bioinseticidas no controle de diversas pragas agrícolas (Parra, 2002; Silva et al., 2012; Almeida, 2020). Estes organismos oferecem vantagens significativas, tais como baixa toxicidade para organismos não alvo, redução do desenvolvimento de resistência e menor impacto ambiental (Alves, 1992; Alves, 1998; Pereira; Almeida; Batista-Filho, 2021).

A eficácia dos conídios aéreos e dos blastosporos de fungos entomopatogênicos depende das condições ambientais e do tipo de praga-alvo. Quando comparados, os conídios aéreos são mais eficazes na dispersão e mais resistentes a fatores como radiação UV e baixa umidade em relação aos blastosporos, justificando o maior uso dessas estruturas em campo (Alves et al., 2008; Ottatti-de-Lima et al., 2010). Por outro lado, os blastosporos são mais infectivos, mas têm uma parede celular menos resistente, o que os torna mais sensíveis à dessecação e, portanto, menos eficientes em ambientes externos, especialmente com baixa umidade, sendo passíveis de utilização quando em meio de cultura que mantenha boa viabilidade das células (Oliveira et al., 2015). A escolha entre conídios e blastosporos deve considerar as características da praga-alvo, formulações e metodologias de aplicação.

O setor agrícola enfrenta inúmeros desafios, especialmente no que diz respeito ao controle de pragas. Nesse contexto, a busca por métodos eficientes e sustentáveis que não apenas minimizem os danos às plantações, mas também reduzam o impacto ambiental e os prejuízos econômicos na cultura da cana-de-açúcar é importante. Portanto, a realização de pesquisas voltadas à inovação em bioprodutos assume destaque, uma vez que, na última década, o uso de agentes de controle biológico tem se consolidado como uma alternativa promissora aos pesticidas sintéticos (Alves, 1998; Tamai et al., 2002; Parra et al., 2002; Parra, 2016).

Com o intuito de contribuir para o enfrentamento desses desafios e para alternativas mais sustentáveis e eficientes para o manejo integrado de pragas, o presente estudo teve como objetivo testar a patogenicidade de blastosporos produzidos em novos meios de cultura, desenvolvidos especificamente para os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* IBCB170 e *M. anisopliae* IBCB383, contra adultos de *S. levis*.

20. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi testar a patogenicidade de blastosporos produzidos em novos meios de cultura com blastosporos dos fungos *B. bassiana* IBCB170 e *M. anisopliae* ICBC383 e suspensões de conídios aéreos de IBCB66 e IBCB425 em adultos de *S. levis*.

21. MATERIAL E MÉTODOS

21.1 Experimentos em laboratório

Os experimentos em laboratório foram realizados na Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico do Centro Avançado de P&D em Sanidade Agropecuária (CAPSA), pertencente ao Instituto Biológico, Campinas, São Paulo.

Para os experimentos, foram utilizados adultos de *S. levis* com idades entre 10 e 40 dias, sem distinção de macho e fêmea. Antes de cada experimento, foram previamente avaliadas a mobilidade e a sanidade dos insetos, que depois foram separados em grupos conforme a quantidade para cada tratamento (Figura 86).



Figura 86 – Verificação de sanidade de *Sphenophorus levis* e separação para uso em experimento. Imagem: Pereira, R.M.C., 2023.

Foram realizados quatro experimentos, sendo dois com os inóculos da seleção S.I-2022 e dois com os inóculos da seleção S.II-2023. A cada dois experimentos, um foi destinado à cepa IBCB170 e outro à cepa IBCB383. Para todos os experimentos, foram

estabelecidos cinco tratamentos, incluindo a testemunha, com cinco repetições e cinco besouros adultos em cada, sem distinção entre machos e fêmeas. O tratamento T1 (testemunha) foi realizado com água, e a concentração dos tratamentos T2 a T5 variou entre 1×10^6 e 5×10^8 (Figura 87).



Figura 87 – Preparação dos inóculos com novos meios de cultura seleção S.I-2022; a) diluição; b) inóculos IBCB170 S.I-2022; c) inóculos IBCB383 S.I-2022. Imagens: Pereira, R.M.C., 2023.

A metodologia de aplicação foi por imersão em 1mL dos inóculos contendo blastosporos de acordo com a concentração determinada para cada tratamento, em grupos de 25 besouros, por 60 segundos. Após os insetos foram separados em grupos de cinco para cada repetição (Figura 88).

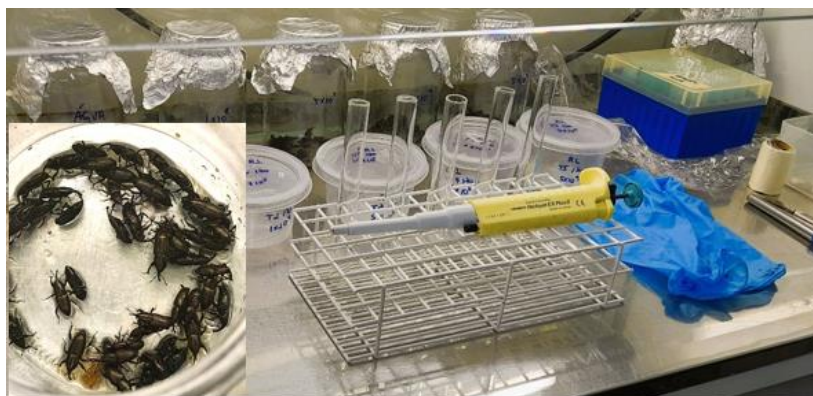


Figura 88 – Experimento com *S. levis*. No detalhe, método de aplicação por banho. Imagens: Pereira, R.M.C., 2024.

Para todos os experimentos, as avaliações de mortalidade foram realizadas durante sete dias, sendo os insetos mortos separados e colocados em câmara úmida, composta por uma placa de Petri estéril contendo um pedaço de algodão hidrófilo umedecido com água. Em seguida, os insetos foram transferidos para uma câmara BOD climatizada a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, por até sete dias, para verificação da esporulação.

21.2 Experimento de campo

No experimento de campo, foram utilizados fermentados líquidos da seleção S.I-2022 contendo células blastospóricas das cepas IBCB170 e IBCB383 testadas em laboratório, além de suspensões fúngicas contendo conídios aéreos das cepas IBCB66 e IBCB425.

O experimento foi conduzido na Usina Santo Antônio (USA), Fazenda Boa Esperança, localizada no município de Sertãozinho, SP. O levantamento inicial da ocorrência da praga foi realizado por meio da contagem de tocos atacados na área de estudo. A área selecionada estava localizada entre os talhões 79 e 78 (Figura 89).



Figura 89 – Croqui da área de instalação do experimento de campo. Fonte: Almeida, J.E.M., 2023.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com três repetições e cinco tratamentos incluindo a testemunha (Tabela 36).

Tabela 36 – Representação dos tratamentos aplicados em campo para inseticida microbiológico com princípio ativo blastosporos de IBCB170 e IBCB383 e suspensões de conídios aéreos IBCB66 e IBCB425

Tratamentos	Cepa	Concentração
T1	IBCB66	10^{13}
T2	IBCB170	10^8
T3	IBCB425	10^{13}
T4	IBCB383	10^8
T5	Testemunha	-

As avaliações foram realizadas por meio da contagem dos tocos atacados por *S. levis* após 30 dias da pulverização das suspensões fúngicas.

Os produtos fermentados testados no experimento foram produzidos em bateladas, por meio de fermentação líquida submersa (FLS), utilizando galões com capacidade de 10 L cada, com os melhores resultados obtidos dos meios de cultura das seleções S.I-2022 e S.II-2023. Cada galão foi inoculado com 100 mL dos inóculos das cepas IBCB170 e IBCB383 (Figura 90).

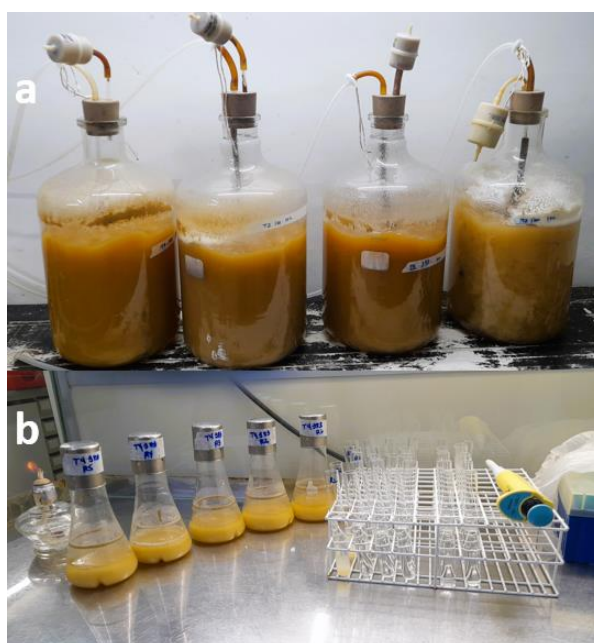


Figura 90 – Preparação de blastósporos em meio líquido para aplicação em campo; a) galões de vidro em fermentação por coluna de bolhas, com blastósporos de IBCB170 e IBCB383; b) Inóculos de T4.S.II-2022-IBCB383 em avaliações para cálculo de concentração e viabilidade. Imagens: Pereira, R.M.C., 2023.

Os galões permaneceram em processo fermentativo por 168 h, com avaliação da concentração de blastósporos por 1 mL em câmara de Neubauer e contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) para cada batelada.

Para a calda com os conídios aéreos, foram utilizadas colônias de *B. bassiana* IBCB66 e de *M. anisopliae* IBCB425, diluídas em água e aplicadas no volume de 100 L/ha. A calda foi preparada nas instalações da Usina Santo Antônio. Foi utilizado um pulverizador tratorizado com capacidade para oito linhas de cana-de-açúcar.

21.3 Análise estatística

A aplicação dos testes estatísticos seguiu os passos de verificação de homogeneidade e normalidade, com aplicação de ANOVA de Welch, seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$) para os experimentos de laboratório, e ANOVA seguido do teste de Duncan ($p < 0,05$) para o experimento de campo. Todos os testes foram realizados por meio do software RStudio®.

22. RESULTADOS

22.1 Experimentos em laboratório

No experimento realizado com blastosporos de IBCB170 com o inóculo T2 da seleção S.I-2022, o tratamento T5 apresentou maior mortalidade. No entanto, apesar das diferenças nas médias das mortalidades, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 91).

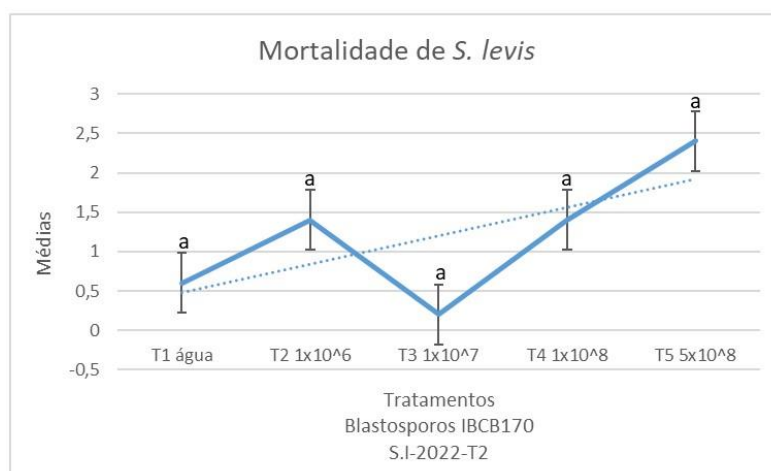


Figura 91 – Média de mortalidade de adultos de *Sphenophorus levis* com blastosporos do inóculo T2 da seleção S.I-2022, após aplicação do teste Tukey ($p > 0,05$).

No experimento realizado com blastosporos de IBCB383 com o inóculo T4 da seleção S.I-2022, o tratamento T5 apresentou maior mortalidade, no entanto, apesar das diferenças nas médias das mortalidades, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 92).

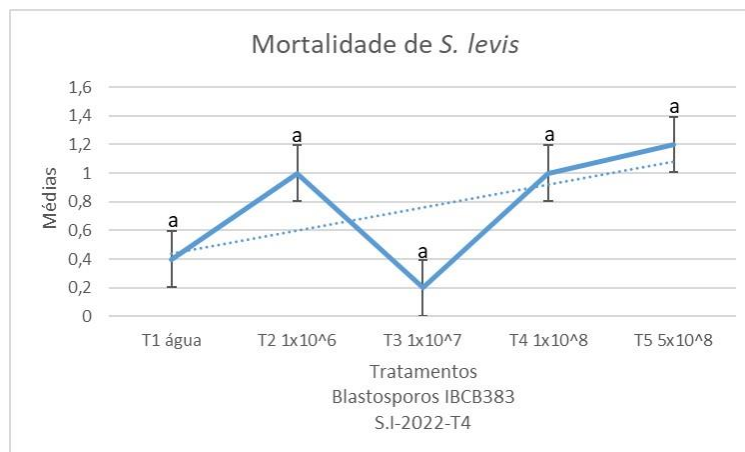


Figura 92 – Média de mortalidade de adultos de *Sphenophorus levis* com blastosporos do inóculo T4 da seleção S.I-2022, após aplicação do teste Tukey ($p > 0,05$).

No experimento realizado com blastosporos de IBCB170 com o inóculo T2 da seleção S.II-2023, o tratamento T2 apresentou maior mortalidade e diferença significativa em relação aos demais (Figura 93).

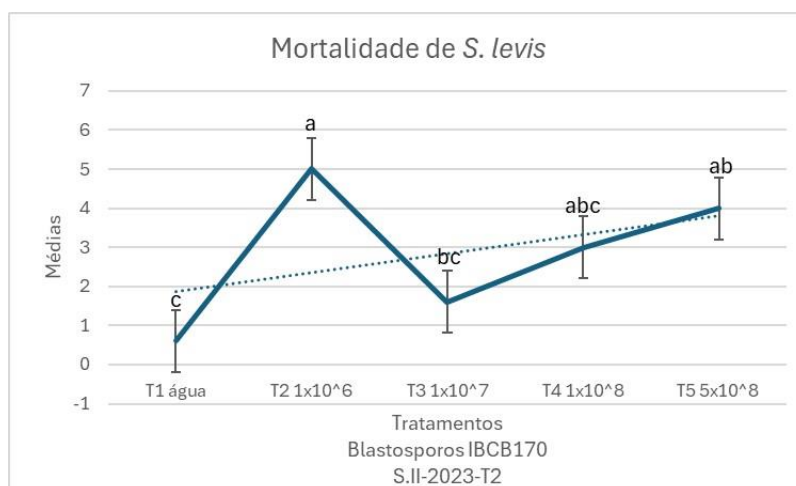


Figura 93 – Média de mortalidade de adultos de *Sphenophorus levis* com blastosporos do inóculo T2 da seleção S.II-2023, após aplicação do teste Tukey ($p > 0,05$).

No experimento realizado com blastosporos de IBCB383 com o inóculo T1 da seleção S.II-2023, o tratamento T5 apresentou maior mortalidade, no entanto, apesar das diferenças nas médias das mortalidades, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 94).

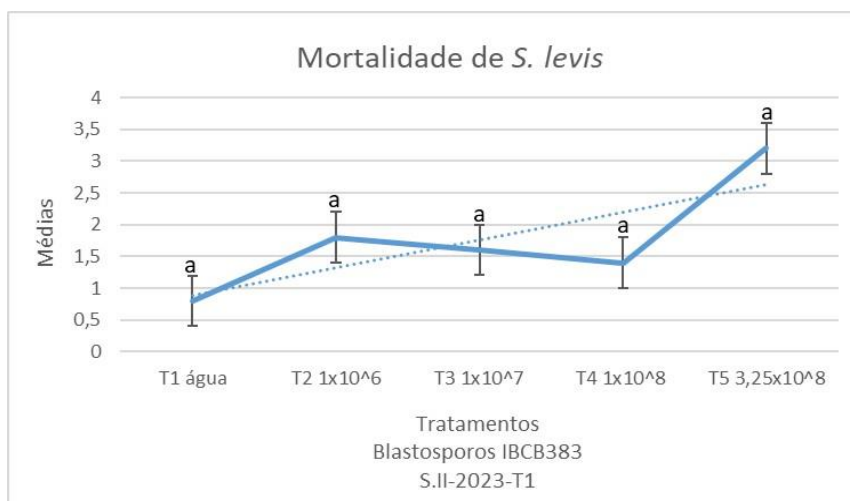


Figura 94 – Média de mortalidade de adultos de *Sphenophorus levis* com blastosporos do inóculo T1 da seleção S.II-2023, após aplicação do teste Tukey ($p > 0,05$).

Nos experimentos realizados com adultos de *Sphenophorus levis* em condições de laboratório, apesar das diferenças observadas nas médias de mortalidade entre os tratamentos (Tabela 37), foram detectadas diferenças estatisticamente significativas apenas no experimento da seleção S.II-2023 para IBCB170.

Tabela 37 – Média de mortalidade de adultos de *Sphenophorus levis* após a aplicação de suspensão com blastosporos com os inóculos das seleções S.I-2022 e S.II-2023 para as cepas IBCB170 e IBCB383

Tratamentos (n=125) ¹	S.I-2022-T2 IBCB170	S.I-2022-T4 IBCB383	S.II-2023-T2 IBCB170	S.II-2023-T1 IBCB383
*T1 Testemunha	0,6 ± 1,34 a	0,4 ± 0,54 a	0,6 ± 0,54 c	0,8 ± 1,09 a
T2 1 x 10 ⁶	1,4 ± 0,89 a	1,0 ± 1,41 a	5,0 ± 0,00 a	1,8 ± 2,16 a
T3 1 x 10 ⁷	0,2 ± 0,44 a	0,2 ± 0,44 a	1,6 ± 2,07 bc	1,6 ± 2,07 a
T4 1 x 10 ⁸	1,4 ± 1,34 a	1,0 ± 0,70 a	3,0 ± 0,70 abc	1,4 ± 2,07 a
T5 5 x 10 ⁸	2,4 ± 1,51 a	1,2 ± 1,64 a	4,0 ± 2,23 ab	3,2 ± 1,92 a
CV (%)	97,89	140,48	50,04	110,60

*T1 = água; média seguida de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

22.2 Experimento em campo

Nos resultados de campo, o tratamento 4 (T4) com blastosporos da cepa IBCB383 teve melhor desempenho na inibição de tocos atacados, com média de 01 toco para a área avaliada. Apesar de não haver diferenças estatísticas quanto a tocos atacados entre os

tratamentos com fungo, os tratamentos com IBCB170 e IBCB383 foram estatisticamente diferentes da testemunha (Figura 95).

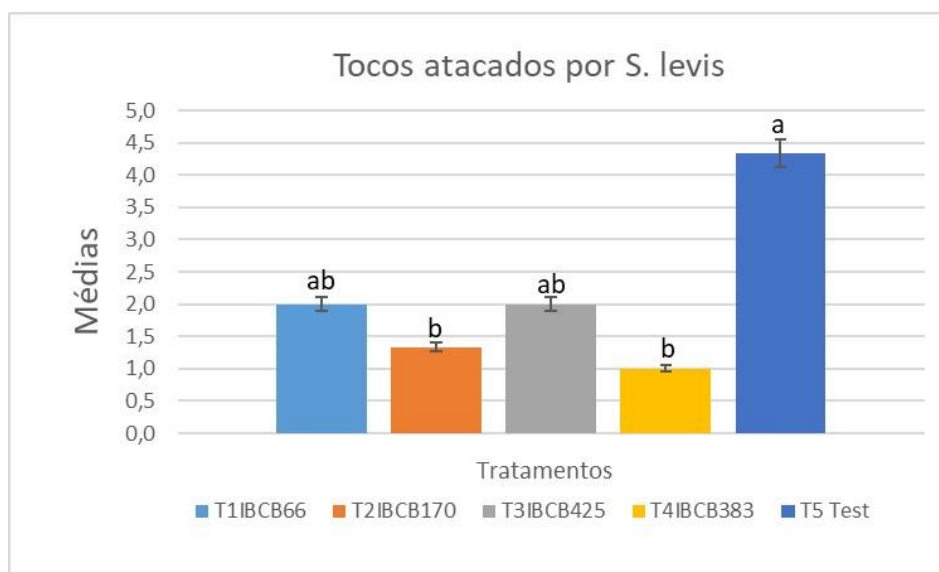


Figura 95 – Médias de tocos atacados por adultos de *S. levis* após aplicação do teste Duncan ($p < 0,05$).

23. DISCUSSÃO

23.1 Experimentos com *S. levis* x blastosporos em condições de laboratório

Conforme os dados obtidos após a aplicação dos testes estatísticos, com a distribuição dos dados e os pressupostos da ANOVA de Welch atendidos, a comparação entre os tratamentos indicou que as médias de mortalidade, em sua maioria, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Isso sugere que a variação dentro dos grupos e entre os tratamentos pode não ter sido suficiente para demonstrar diferenças reais.

A variabilidade na eficácia de fungos entomopatogênicos pode ser influenciada tanto pelas características dos organismos-alvo quanto pelas propriedades intrínsecas dos fungos utilizados. Os autores Correa et al. (2020) destacaram que os fungos *Beauveria bassiana* e *Cordyceps fumosorosea* apresentaram diferenças significativas na virulência quando cultivados como blastosporos, em comparação com conídios aéreos. Nesse contexto, os blastosporos demonstraram maior sensibilidade a fatores abióticos, como radiação ultravioleta e desidratação. De forma semelhante, Quesada-Moraga et al. (2024) observaram

que cepas de *Metarhizium anisopliae* tiveram desempenho inferior em campo quando os blastosporos foram expostos a altas temperaturas e baixa umidade, em relação aos conídios. Esses resultados sugerem que ajustes no protocolo experimental, como o aumento do tamanho da amostra ou o controle mais rigoroso de variáveis ambientais, podem evidenciar diferenças mais marcantes na eficácia desses fungos.

Devido à ausência de esporulação observada nos insetos mortos durante os experimentos realizados neste estudo, as análises estatísticas consideraram apenas a mortalidade total, e não a mortalidade confirmada, para ambas as cepas testadas. A falta de esporulação pode ser atribuída à incapacidade do patógeno de completar o ciclo de infecção nos hospedeiros mortos. Conforme Shimazu (1994), esse fenômeno é relativamente comum em infecções por *Entomophaga maimaiga*, especialmente sob condições ambientais desfavoráveis à esporulação após a morte do inseto. Esse comportamento foi corroborado por Hajek e Shimazu (1996), que relataram que, mesmo quando *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* provocam altas taxas de mortalidade, a esporulação pode ser significativamente inibida por fatores como baixa umidade relativa ou morte rápida do hospedeiro antes do desenvolvimento fúngico completo. Portanto, a ausência de esporulação não indica necessariamente uma falha na infecção, mas sim uma interrupção no ciclo reprodutivo do fungo (Hajek, 1997).

Conforme Alves (1998), após a penetração do fungo no tegumento, a morte do inseto pode ocorrer indiretamente por danos mecânicos, exaustão de nutrientes ou alterações fisiológicas. Além disso, o fungo pode redirecionar seu esforço reprodutivo para a sobrevivência em resposta a condições adversas, como baixa umidade na porção interna do hospedeiro, comprometendo a conidiogênese. Loureiro et al. (2002) já haviam destacado que a baixa umidade relativa é um fator crucial que afeta a germinação e o desenvolvimento de fungos entomopatogênicos, particularmente *M. anisopliae* e *B. bassiana*, resultando em uma redução significativa da esporulação em substratos secos. De forma consistente, Veloso et al. (2023) observaram que a exposição de conídios de *M. anisopliae* a ambientes com umidade inferior a 70% inibiu a formação de estruturas conidiogênicas em hospedeiros secos. Essa resposta adaptativa pode ser ainda maior na presença de compostos tóxicos, como pesticidas residuais nos tecidos dos hospedeiros, afetando negativamente a viabilidade reprodutiva dos fungos (De Sá-Santos et al., 2021).

A mortalidade constatada em experimentos de laboratório com blastosporos obtidos da S.I-2022 e S.II-2023 para as cepas IBCB170 e IBCB383, mostraram que os blastosporos foram infectivos à praga alvo deste trabalho, *S. levis*. Isso corrobora com Alves

et al. (1998), que aponta que em testes de laboratório tem a vantagem de expor o patógeno à atividade máxima possível dos produtos avaliados, o que é diferente em condições de campo.

23.2 Experimento com *S. levis* x fungos em condições de campo

Como era esperado, o tratamento controle (T5) apresentou menor eficiência, evidenciando maior suscetibilidade dos tocos de cana-de-açúcar ao ataque de adultos de *S. levis*. Em contraste com os resultados obtidos em laboratório, os blastosporos da cepa IBCB383 demonstraram maior eficácia no controle de *S. levis* em condições de campo. Esse achado está em concordância com a literatura, que destaca a eficiência de fungos entomopatogênicos como *B. bassiana* e *M. anisopliae* no manejo de pragas que colonizam tocos de cana-de-açúcar.

Conforme Almeida e Batista-Filho (2006), *M. anisopliae* é amplamente utilizado no manejo integrado de pragas, sendo particularmente eficaz no controle de cigarrinhas, como *Mahanarva fimbriolata*, uma importante praga radicular que afeta os tocos da cana-de-açúcar.

Em trabalho similar em campo, Loureiro (2004) realizado por pulverização com 2kg/ha de arroz+fungo, contendo $1,5 \times 10^{12}$ conídios/ha, que após 30 dias da pulverização, os isolados IBCB 408 e IBCB 425 apresentaram eficiência de controle de 63 e 62%, para as ninfas e para os adultos foi de 100%. Apesar da cepa usada por Loureiro (2004) ser IBCB425, isso mostra que os conídios aéreos de *M. anisopliae* são infectivos aos adultos da praga alvo deste estudo.

Em estudos conduzidos por Vinha et al. (2020), a eficácia de *M. anisopliae* (IBCB 425) e *B. bassiana* (IBCB 66) no controle de *S. levis* foi avaliada utilizando produtos formulados comercialmente. Os autores observaram que *B. bassiana* reduziu a população da praga, embora sem diferença estatística em relação ao controle. Em contrapartida, *M. anisopliae* apresentou diferenças significativas nos tratamentos, especialmente em colmos danificados. Esses resultados reforçam a eficácia de *M. anisopliae* no controle de adultos de *S. levis*, embora a cepa e a estrutura infectiva utilizadas no estudo sejam diferentes da cepa IBCB383 empregada neste trabalho.

Na pesquisa realizada por Simi (2014), a seleção de isolados de fungos para o controle de *S. levis* apontou *B. bassiana* (IBCB 170) e *M. anisopliae* (IBCB 383) como os mais eficientes, promovendo taxas de mortalidade de 80% e 72%, respectivamente. Embora

essa pesquisa não tenha utilizado blastosporos como estrutura infectiva, os resultados confirmam a eficácia da cepa de *M. anisopliae* IBCB383 utilizada neste estudo.

Apesar das diferenças entre os experimentos de laboratório e de campo, este trabalho demonstrou que houve mortalidade em adultos de *S. levis* tanto por blastosporos da cepa IBCB170 quanto para a cepa de IBCB383, além da diminuição de tocos atacados em campo. No entanto, fica a sugestão para realização de mais pesquisas para aperfeiçoar processos de produção por fermentação líquida para o uso de blastosporos em campo e a confirmação mais robusta da eficiência de controle biológico de adultos de *S. levis*, destacando o uso da cepa IBCB383.

24. CONCLUSÕES

- O inóculo da seleção S.II-2023-T2 IBCB170, mostrou-se mais eficiente no controle biológico de *S. levis* em condições de laboratório.
- Blastosporos de IBCB383 tiveram baixo desempenho na infecção de adultos de *S. levis* em condições de laboratório.
- A utilização de *B. bassiana* e *M. anisopliae* diminuíram a quantidades de tocos atacados em campo.
- O fungo *M. anisopliae* em suspensão com blastosporos foi mais eficiente no controle de *S. levis* em condições de campo.

25. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. E. M. de. Biofábricas para produção de micopesticidas no Brasil: oportunidades de negócio e inovações / Bio-factories for the production of mycopesticides in Brazil: business opportunities and innovations. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 2444–2557, 2020. DOI: 10.34188/bjaerv3n3-162. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJAER/article/view/16950>. Acesso em: 14 mar. 2024.
- ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. Controle Biológico da Cigarrinha-da-Raiz da Cana-de-Açúcar com o Fungo *Metarhizium anisopliae*. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, n.16, São Paulo: Instituto Biológico, 2006, 19 p.
- ALMEIDA, L. C. **Bicudo da cana-de-açúcar: boletim técnico C.T.C.** Piracicaba: Centro de Tecnologia Canavieira, 2005. 3 p.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**, 2.ed. Piracicaba: Fealq, 1998. p.289-381.
- ALVES, S.B.et al. (2008) **Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina**. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B (Eds.). Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba: Fealq, 2008. p.69-110.
- BOTELHO, P. S. M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*.(In): PARRA, J.R.P., BOTELHO, P.S.M., CORREA-FERREIRA, B.S., BENTO, JMS (eds.) **Controle Biológico no Brasil: Parasitoides e Predadores**. 2002.
- BENTO, J. M. (Eds.). Controle Biológico no Brasil: parasitoides e predadores. São Paulo: **Manole**, p. 409-425, 2002.
- BRILHANTE, F. D. et al., REVISÃO DE LITERATURA: Uso de *Beauveria bassiana* no controle biológico de *Sphenophorus levis* Vaurie 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar. **Manejo de pragas e doenças: a busca por formas sustentáveis de controle**. vol 2, n. 1, p. 133-150, 2022.
- CORRÊA, Bianca et al. Comparative analysis of blastospore production and virulence of *Beauveria bassiana* and *Cordyceps fumosorosea* against soybean pests. **BioControl**, v. 65, n. 3, p. 323-337, 2020.
- DE SÁ SANTOS, P. et al. (2021) Nutritional impact of low-cost substrates on biphasic fermentation for conidia production of the fungal biopesticide *Metarhizium anisopliae*. **Bioresource Technology Reports**, v. 13, p. 100619, 2021.
- DINARDO-MIRANDA, L. L. Nematoides e pragas da cana-de-açúcar. Campinas: **Instituto Agrônomo**, 2014.
- DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V. Sugarcane straw and the populations of pests and nematodes. **Scientia Agricola**, v.70, n.5, p.x-x, September/October 2013.

HAJEK, A. E. Entomophaga maimaiga reproductive output is determined by the spore type initiating an infection. **Mycological Research**, v. 101, n. 8, p. 971-974, 1997.

HAJEK, Ann E.; SHIMAZU, Mitsuaki. Types of spores produced by *Entomophaga maimaiga* infecting the gypsy moth *Lymantria dispar*. **Canadian Journal of Botany**, v. 74, n. 5, p. 708-715, 1996.

LOUREIRO, E. S. **Seleção e avaliação de campo de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. para o controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854)(Hemiptera: Cercopidae)**. 2004. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/95d3d0b3-51fd-4a5c-a6fd-b164da4edc39/content>> Acesso em: 20 de Nov. 2024.

LOUREIRO, E.S. et al. Efeito de produtos Fitossanitários Químicos Utilizados em Alface e Crisântemo Sobre Fungos Entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 2, p. 263-269, June 2002.

OLIVEIRA, D. G. P. et al. (2015) A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. **Journal of microbiological methods**, v. 119, p. 44-52, 2015.

OTTATI-DE-LIMA, et al. Produção semissólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e temperatura sobre propágulos desses entomopatogênicos. **Arq. Inst. Biológico**, v. 77, n. 4, p. 651-659, 2010.

PARRA, J. R. P., **Situação do Controle Biológico no Brasil**. Disponível em: http://www.fapesp.br/eventos/2016/02/cb/Jose_Roberto.pdf.>. Acesso em: 22 jun. 2018.

PARRA, J. R. P. et al. (2002) Controle Biológico: uma revisão inter e multidisciplinar. **Controbiolog**, cap. 8, p. 125-142, 2002. Disponível em:<https://www.researchgate.net/profile/Jose_Mauricio_Bento/publication/318826649_Control_Biologico_Uma_Visao_Inter_e_Multidisciplinar_in_portuguese/links/5980804baca272ebd41cc037/Controle-Biologico-Uma-Visao-Inter-e-Multidisciplinar-in-portuguese.pdf>. Acesso em: 16 abr. 2024.

PEREIRA, R. M. C.; ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. Applying different infective structures of *Beauveria bassiana* to *Coffea arabica* infested with *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) under field. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 89, 2023. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000182022>

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

QUESADA-MORAGA, Enrique et al. Key role of environmental competence in successful use of entomopathogenic fungi in microbial pest control. **Journal of Pest Science**, v. 97, n. 1, p. 1-15, 2024.

RIBEIRO, H.; FICARELLI, T. R. A. Queimadas nos canaviais e perspectivas dos cortadores de cana-de-açúcar em Macatuba, São Paulo. **Saúde e Sociedade**. São Paulo, v.19, n.1, p.48-63, 2010.

SHIMAZU, M. Potential of the cerambycid-parasitic type of *Beauveria brongniartii* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for microbial control of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 29, n. 1, p. 127- 130, 1994.

SILVA, E. A. R. et al., (2012) Seleção de isolados de fungos entomopatogênico para o controle de *Leptopharsa heveae* (Hemiptera: Heteroptera, Tingidae). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias, Botucatu, SP, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 79, n.4, p. 549 – 556.

TAMAI, M. A. et al. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria Bassiana* (BALS.) VUILL. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.69. p. 89-96, 2002.

VAURIE, P. Revision of the genus *Sphenophorus* in South America. American Museum Novitates, **New York**, n. 2659, p. 1-30, 1978.

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

VILLAS BOAS, A. M.; ALVES, S. B. Patogenicidade de *Beauveria spp.* E seu efeito associado ao inseticida monocrotofós sobre *Castnia licus* (Drury, 1770) (Lepidoptera: Castiniidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.17, n.2, p. 305-332, 1988.

VINHA, F. B. et al., (2020) Entomopathogenic fungi on the control of *Sphenophorus levis* in sugarcane crop. **Scientia Agraria Paranaensis**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 280–288, 2020. DOI: 10.18188/sap.v19i3.24426. Disponível em: <https://saber.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/view/24426>. Acesso em: 1 dez. 2024.