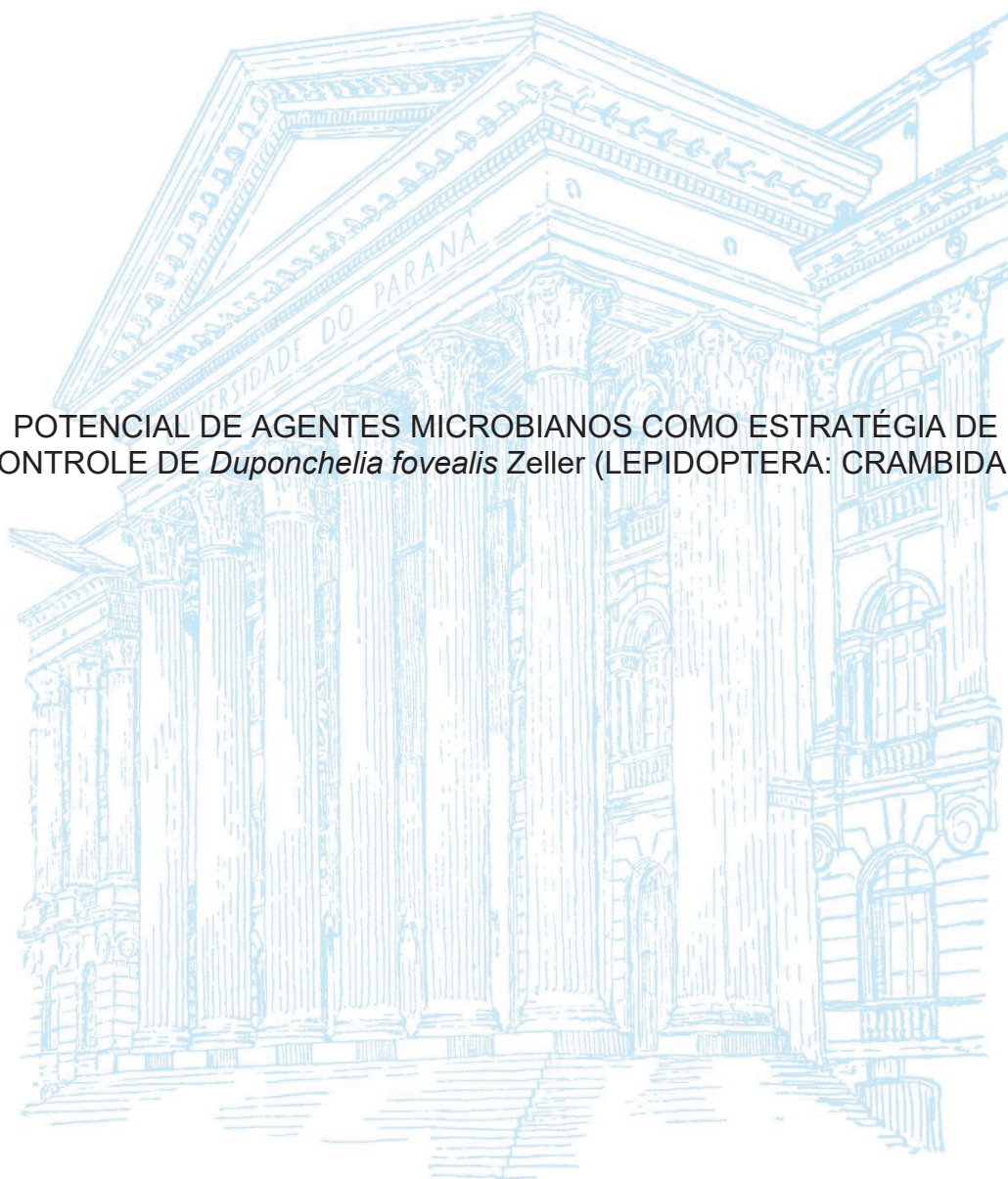


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAÍSA SIQUEIRA DA LUZ

POTENCIAL DE AGENTES MICROBIANOS COMO ESTRATÉGIA DE
CONTROLE DE *Duponchelia fovealis* Zeller (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)



CURITIBA

2022

THAÍSA SIQUEIRA DA LUZ

POTENCIAL DE AGENTES MICROBIANOS COMO ESTRATÉGIA DE
CONTROLE DE *Duponchelia fovealis* Zeller (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração em microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel

Co-orientador: Dr^a. Carolina Gracia Poitevin

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Luz, Thaísa Siqueira da
Potencial de agentes microbianos como estratégia de controle
de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) / Thaísa
Siqueira da Luz. – Curitiba, 2022.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia, Parasitologia e Patologia..
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel.
Coorientadora: Dr^a. Carolina Gracia Poitevin.

1. Fungos entomopatogênicos. 2. Pragas agrícolas – Controle
biológico. 3. Lagartas. 4. Morango - Cultivo. I. Pimentel, Ida
Chapaval. II. Poitevin, Carolina Gracia, 1987-. III. Universidade
Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. IV.
Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **THAISA SIQUEIRA DA LUZ** intitulada: **POTENCIAL DE AGENTES MICROBIANOS COMO ESTRATÉGIA DE CONTROLE DE *Duponchelia fovealis* Zeller (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**, sob orientação da Profa. Dra. IDA CHAPAVAL PIMENTEL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 06 de Setembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

06/09/2022 15:15:41.0

IDA CHAPAVAL PIMENTEL

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

06/09/2022 13:41:58.0

MAGDA FERNANDA PAIXÃO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

07/09/2022 16:38:42.0

JOATAN MACHADO DA ROSA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1695 - E-mail: posmpp@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 220604

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 220604

AGRADECIMENTOS

Ao bom Deus, primeiramente, pela graça da vida e presença constante em todos os momentos vividos até aqui.

Aos meus pais, Vlademir e Georgina, pela educação, exemplos éticos e morais. Vocês me inspiram.

Ao meu companheiro de vida, Larriê Cardoso, pelo apoio incondicional, paciência e por estar comigo em todos os momentos em que precisei. É muito bom compartilhar a vida com você.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Ida Pimentel, pela oportunidade e acolhimento desde o princípio. A sua compreensão nos momentos difíceis e de dúvidas pelos quais passei, permitindo que meu tempo fluísse, respeitosamente, foram fundamentais nesta etapa da minha vida.

Em especial, à minha co-orientadora Dr^a Carolina Gracia Poitevin pelos conhecimentos compartilhados e por toda a ajuda disponibilizada. Mesmo à distância sempre esteve presente me ensinando os “primeiros passos” no trabalho com microrganismos entomopatogênicos, além de sempre estar disposta a esclarecer minhas dúvidas. Sou verdadeiramente grata.

À Prof^a Dr^a Maria Aparecida Zawadneak, por toda orientação na área de entomologia e por todo auxílio em conseguir os produtos biológicos necessários para a execução deste trabalho.

Ao Prof^o Dr^o Joatan Machado da Rosa, pelas ideias, incentivo e sugestões valiosas para a execução deste trabalho.

Ao Prof^o Carlos Eduardo Nogueira Martins do Instituto Federal Catarinense, pela ajuda nas análises estatísticas.

À Dr^a Magda Fernanda Paixão por colaborar na avaliação deste trabalho.

Um agradecimento especial para quem trabalhou ao meu lado na realização deste trabalho: Rubens Zimmermann, obrigada por amenizar os momentos difíceis e por toda ajuda dada para a execução dos experimentos; Jason Furuie, obrigada por ter me ensinado todos os procedimentos de laboratório e por toda ajuda na realização dos experimentos, e Edson Mazarotto, obrigada por toda ajuda e conhecimento compartilhado. Vocês foram fundamentais.

À BioAgro pelo fornecimento das mudas. À Biocert, Koppert, e Simbiose® pelo fornecimento dos bioinseticidas comerciais.

Ao LabMicro e Laboratório Costa Lima, local de trabalho durante todo mestrado, por todo material cedido, os quais foram fundamentais para execução deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado, e ao CNPq, pelo financiamento deste projeto.

RESUMO GERAL

A lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae), é uma praga exótica responsável por danos significativos ao morangueiro em diversas regiões produtoras do mundo. No Brasil, inexistem inseticidas registrados para o seu controle. Diante desse cenário, a utilização do controle biológico, através do uso de microrganismos entomopatogênicos, tem sido relatado como uma alternativa promissora no manejo desta praga. Esses agentes podem desempenhar um papel fundamental no manejo integrado de pragas (MIP) contribuindo para a produção orgânica do morango. Esta pesquisa consistiu na avaliação de isolados patogênicos obtidos da Coleção Microbiológica da Rede Paranaense (CMRP) – TAXonline e de inseticidas microbiológicos comerciais contra lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis* em laboratório. Os isolados e produtos comerciais que causaram taxas de mortalidade $\geq 80\%$ foram avaliados quanto ao grau de toxicidade para estimativa da concentração letal média (CL_{50}), tempo letal médio (TL_{50}) e tempo médio de sobrevivência (TMS) através do método de pulverização direta. Na sequência, foram conduzidos testes de suscetibilidade em todos os estágios imaturos de desenvolvimento de *D. fovealis* no valor da CL_{50} dos isolados e produtos comerciais anteriormente selecionados. Dos nove isolados de *B. bassiana* avaliados, apenas os fungos 4485 e 4488 apresentaram mortalidade superior a 80%. O isolado 4488 apresentou toxicidade 80,6% maior e tempo letal 1,16% menor comparado ao isolado 4485. Entretanto, após sete dias, o TMS das lagartas foi 14,05% menor quando pulverizados com o isolado 4485. Os isolados fúngicos 4485 e 4488 reduziram a viabilidade de ovos em 8,31% e 6,74%, respectivamente, e causaram, aproximadamente, 30% de mortalidade nas pupas de *D. fovealis*. Estes isolados foram eficazes no controle de lagartas de *D. fovealis*, sendo que ambos foram mais efetivos nos primeiros estágios de desenvolvimento. Entre os produtos biológicos comerciais avaliados, apenas o bioinseticida a base de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (HD-1 CCT 1306) foi efetivo no controle de *D. fovealis* em todos os estágios de desenvolvimento, com taxas de mortalidade variando de 41 a 91%. Porém, observou-se maior virulência no primeiro (91,75%) e segundo (79,8%) estágio de desenvolvimento. Além disso, esse produto comercial requereu uma concentração menor (70 $\mu\text{L}/\text{mL}$) para atingir a CL_{50} do que a indicada pelo fabricante para lagartas de *Helicoverpa armigera* e *Chrysodeixis includens* (150 $\mu\text{L}/\text{mL}$), TL_{50} de 136,56 h e TMS de 85,52 h. Os resultados obtidos demonstram que os isolados 4485 e 4488 de *B. bassiana* e o bioinseticida a base de *Bt* podem ser uma estratégia de manejo viável para o controle *D. fovealis*, de modo a reduzir o uso de produtos químicos contribuindo para uma produção mais sustentável de morangos no Brasil.

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos; *Beauveria bassiana*; *Bacillus thuringiensis*; Biocontrole; Lagarta-da-coroa; Morangueiro.

GENERAL ABSTRACT

The European pepper moth, *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae), is an exotic pest responsible for significant damage to the strawberry crop in several producing regions of the world. In Brazil, there are no registered insecticides for their control. Given this scenario, the utilization of biological control, through the use of entomopathogenic microorganisms has been reported as a promising alternative in the management of this pest. These agents can play a key role in integrated pest management (IPM) contributing to the organic strawberry production. This research consisted in the evaluation of pathogenic strains obtained from the Microbiological Collection of the Paranaense Network (CMRP) – TAXonline and commercial microbiological insecticides against third instar larvae of *D. fovealis* in laboratory. The isolates and commercial products that caused mortality rates $\geq 80\%$ were evaluated for degree of toxicity to estimate mean lethal concentration (LC_{50}), mean lethal time (LT_{50}) and mean survival time (MST) using the direct spray method. Subsequently, susceptibility tests were carried out at all stages of development of *D. fovealis* on the LC_{50} value of the isolates and commercial products previously selected. Of the nine isolates of *B. bassiana* evaluated, only 4485 and 4488 showed potential as bioagents to control *D. fovealis*, with mortality higher than 80%. Isolate 4488 showed 80.6% higher toxicity and 1.16% lower lethal time compared to isolate 4485. However, after seven days, the TMS of the larvae was 14.05% lower when submitted to isolate 4485. Fungal isolates 4485 and 4488 reduced egg viability by 8,31% and 6,74%, respectively and caused about 30% mortality in *D. fovealis* pupae. These isolates were effective in controlling *D. fovealis* larvae, both of which were more effective in the early stages of development. Among the commercial biological products evaluated, only the bioinsecticide based on *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (HD-1 CCT 1306) was effective in controlling *D. fovealis* at all stages of development, with mortality rates ranging from 41 to 91%. However, greater virulence was observed in the first (91.75%) and second (79.8%) stages of development. In addition, this commercial product demanded a lower concentration (70 $\mu\text{L}/\text{mL}$) to reach the LC_{50} than that indicated by the manufacturer for *Helicoverpa armigera* and *Chrysodeixis includens* (150 $\mu\text{L}/\text{mL}$), LT_{50} of 136.56 h e MST of 85.52 h. The results obtained demonstrate that two isolates of *B. bassiana* and a bioinsecticide based on *Bt* can be a viable management strategy to control *D. fovealis* in order to reduce to chemical products, contributing to a more sustainable production of strawberries in Brazil.

Keywords: Entomopathogenic fungi; *Beauveria bassiana*; *Bacillus thuringiensis*; Biocontrol; European pepper moth; Strawberry.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 – FASES DO DESENVOLVIMENTO DE <i>Duponchelia fovealis</i>	24
FIGURA 2 – FASES DO DESENVOLVIMENTO DE <i>Duponchelia fovealis</i> . A: MACHO; B: FÊMEA; C: OVOS; D: LAGARTA NO QUINTO ÍNSTAR DE DESENVOLVIMENTO; E: PUPAS; F E G: DANOS NO MORANGO, H: OVOS APÓS OVIPOSIÇÃO; I, J: OVOS PRÓXIMO AO PERÍODO DE ECLOSÃO. 25	
FIGURA 3 – MECANISMO DE AÇÃO DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.	35
FIGURA 4 – ATIVIDADE INSETICIDA DAS DELTA-ENDOTOXINAS Cry e Cyt CONTRA AS ORDENS DIPTERA, COLEOPTERA, LEPIDOPTERA, HEMIPTERA E HYMENOPTERA.	37
FIGURA 5 – MECANISMO DE AÇÃO DE <i>Bacillus thuringiensis</i> PELA AÇÃO DE DELTA-ENDOTOXINAS Cry SEGUNDO O MODELO DE LIGAÇÃO SEQUENCIAL.	38
FIGURA 6 – MECANISMO DE AÇÃO DE <i>Bacillus thuringiensis</i> PELA AÇÃO DE DELTA-ENDOTOXINAS Cry SEGUNDO O MODELO DE VIA DE SINALIZAÇÃO.	39
FIGURA 7 – FASES DO DESENVOLVIMENTO DE <i>Duponchelia fovealis</i> COM POSSÍVEIS MÉTODOS DE MANEJO DE ACORDO COM O ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO DA PRAGA.	40

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 – MONTAGEM DO EXPERIMENTO DE PATOGENICIDADE CONTRA <i>Duponchelia fovealis</i> . FOLHA DE MORANGO COM O PECÍOLO EMBRULHADO EM ALGODÃO E MERGULHADO EM 15 ML DE ÁGUA (A), UMA RÉPLICA COM 10 LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR (B) E UMA REPETIÇÃO NO TEMPO COM CINCO RÉPLICAS (C).	55
FIGURA 2 – TESTE DE GERMINAÇÃO EM MEIO BDA APÓS 18 HORAS DE INCUBAÇÃO. VISUALIZAÇÃO EM MICROSCÓPIO ÓPTICO (400×) DO CONÍDIO GERMINADO (A) E CONÍDIO NÃO GERMINADO (B).	60
FIGURA 3 – MORTALIDADE (% MÉDIA ± ERRO PADRÃO) DE LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE <i>Duponchelia fovealis</i> PULVERIZADAS COM	

SUSPENSÃO FÚNGICA NA CONCENTRAÇÃO DE 10^9 CONÍDIOS/mL, APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ DE UR e 14 HORAS DE FOTOFASE.....	60
FIGURA 4 – EXTRUSÃO DO FUNGO <i>Beauveria bassiana</i> EM LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE <i>Duponchelia fovealis</i> AVALIADA EM ESTEREOMICROSCÓPIO ÓPTICO APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ± 2 °C, $60 \pm 10\%$ DE UR E 12 HORAS DE FOTOFASE. ISOLADO 4485 (A), ISOLADO 4488 (B) E LAGARTA COM MELANIZAÇÃO CUTICULAR (C). AUMENTO DE 20×.....	61
FIGURA 5 – CURVA DE SOBREVIVÊNCIA (HORAS) DE LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE <i>Duponchelia fovealis</i> COM OS ISOLADOS 4485 NA CONCENTRAÇÃO DE $1,7 \times 10^7$ CONÍDIOS/mL E 4488 NA CONCENTRAÇÃO DE $3,3 \times 10^6$ CONÍDIOS/mL DE <i>Beauveria bassiana</i> USANDO O TESTE KAPLAN-MEIER.....	63
FIGURA 6 – MORTALIDADE (% MÉDIA \pm ERRO PADRÃO) DE LAGARTAS DE <i>Duponchelia fovealis</i> PULVERIZADAS COM SUSPENSÃO FÚNGICA NA CONCENTRAÇÃO DE $1,7 \times 10^7$ CONÍDIOS/mL PARA O ISOLADO 4485 E $3,3 \times 10^6$ CONÍDIOS/mL PARA O ISOLADO 4488, APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ DE UR e 14 HORAS DE FOTOFASE.....	64
FIGURA 7– EXTRUSÃO DO FUNGO <i>Beauveria bassiana</i> EM PUPAS DE <i>Duponchelia fovealis</i> AVALIADA EM ESTEREOMICROSCÓPIO ÓPTICO APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ± 2 °C, $60 \pm 10\%$ DE UR E 12 HORAS DE FOTOFASE (20×). ISOLADO 4485 (A) E ISOLADO 4488 (B).....	65

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 – MORTALIDADE (% MÉDIA \pm ERRO PADRÃO) DE LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE <i>Duponchelia fovealis</i> PULVERIZADAS COM OS PRODUTOS COMERCIAIS ESALQ PL63 E ESALQ E9 NA CONCENTRAÇÃO DE 10^5 CONÍDIOS/mL, Simbi BB 15 E IBCB 425b NA CONCENTRAÇÃO DE 10^6 CONÍDIOS/mL, IBCB 66, IBCB 425a, ESALQ 1296, ESALQ 4778 NA CONCENTRAÇÃO DE 10^7 CONÍDIOS/mL E HD-1 NA CONCENTRAÇÃO DE 88 UIP/mg, APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ DE UR e 14 HORAS DE FOTOFASE.	85
---	----

FIGURA 2 – LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE <i>Duponchelia fovealis</i> EXTERIORIZANDO OS ISOLADOS FÚNGICOS PRESENTE NOS FORMULADOS COMERCIAIS BOVERIL® WP PL63 (A), BEAUVERIA OLIGOS® (B), FLYCONTROL® (C), METHACONTROL® (D), OCTANE® (E) E ISACONTROL® (F) APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO 25 ± 2 °C, 60 ± 10% DE UR E 12 HORAS DE FOTOFASE. LAGARTA DE TERCEIRO ÍNSTAR DE <i>Duponchelia fovealis</i> APÓS 5 DIAS DA APLICAÇÃO DE BTCONTROL (G). AUMENTO DE 20×.	86
FIGURA 3 – CURVA DE SOBREVIVÊNCIA (HORAS) DE LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE <i>Duponchelia fovealis</i> COM A LINHAGEM HD-1 NA CONCENTRAÇÃO DE 70,84 µl/mL DE <i>Bacillus thuringiensis</i> USANDO O TESTE KAPLAN-MEIER.	87
FIGURA 4 – MORTALIDADE (% MÉDIA ± ERRO PADRÃO) DE LAGARTAS DE <i>Duponchelia fovealis</i> PULVERIZADAS COM O PRODUTO COMERCIAL A BASE DE <i>Bacillus thuringiensis</i> (ISOLADO HD-1) NA CONCENTRAÇÃO DE 70,84 µl/mL, APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ± 2 °C, 70 ± 10% DE UR e 14 HORAS DE FOTOFASE.	88

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1 – LINHAGENS DE <i>Beauveria bassiana</i> ISOLADAS DE <i>Lema bilineata</i> E SEU NÚMERO DE ACESSO NO GENBANK.	53
TABELA 2 – GERMINAÇÃO (%) DOS ISOLADOS DE <i>Beauveria bassiana</i> EM MEIO BDA NA CONCENTRAÇÃO 1×10^6 CONÍDIOS/mL APÓS 18 HORAS DE INCUBAÇÃO A 28 ± 1 °C E 14 HORAS DE FOTOFASE.....	59
TABELA 3 – ANÁLISE DE PROBIT PARA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA, TEMPO LETAL MÉDIO E TESTE LOG-RANK PARA ESTIMATIVA DO TEMPO MÉDIO DE SOBREVIVÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>Beauveria bassiana</i> 4485 e 4488 CONTRA LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE <i>Duponchelia fovealis</i>	62
TABELA 4 – OVOS NÃO VIÁVEIS (% MÉDIA \pm ERRO PADRÃO) DE <i>Duponchelia fovealis</i> PULVERIZADOS COM SUSPENSÃO FÚNGICA DOS ISOLADOS 4485 E 4488 APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ DE UR e 14 HORAS DE FOTOFASE.	64
TABELA 5 – PUPAS NÃO VIÁVEIS (% MÉDIA \pm ERRO PADRÃO) DE <i>Duponchelia fovealis</i> PULVERIZADAS COM SUSPENSÃO FÚNGICA DOS ISOLADOS 4485 E 4488 APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ DE UR e 14 HORAS DE FOTOFASE.	65

CAPÍTULO 3

TABELA 1 – BIOINSETICIDAS TESTADOS CONTRA LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE <i>Duponchelia fovealis</i> EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.	80
TABELA 2 – VIABILIDADE (%) DOS PRODUTOS COMERCIAIS. OS CONÍDIOS FÚNGICOS FORAM INOCULADOS EM MEIO BDA NA CONCENTRAÇÃO 1×10^6 CONÍDIOS/mL E AVALIADOS APÓS 18 HORAS DE INCUBAÇÃO A 28 ± 1 °C E 14 HORAS DE FOTOFASE. OS ESPOROS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> foram INOCULADOS EM ÁGAR NUTRIENTE E AVALIADOS APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO A 30 ± 4 °C E CONTADOS NA DILUIÇÃO 1:10.000.000.....	85
TABELA 3 – ANÁLISE DE PROBIT PARA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA, TEMPO LETAL MÉDIO E TESTE LOG-RANK PARA	

ESTIMATIVA DO TEMPO MÉDIO DE SOBREVIVÊNCIA DO ISOLADO HD-1 DE <i>Bacillus thuringiensis</i> CONTRA LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE <i>Duponchelia fovealis</i>	87
---	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
OBJETIVOS	18
Objetivo geral	18
Objetivos específicos	18
REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO 1. REVISÃO DE LITERATURA	21
1. O morangueiro	21
2. <i>Duponchelia fovealis</i> (Zeller, 1847)	23
3. Uso de inseticidas sintéticos e seus impactos	26
4. Biopesticidas	29
5. Controle biológico de pragas	31
5.1 Fungos entomopatogênicos	33
5.2 <i>Bacillus thuringiensis</i>	35
6. Alternativas para o manejo de <i>Duponchelia fovealis</i>	39
REFERÊNCIAS	42
CAPÍTULO 02 – POTENCIAL DE ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COMO ESTRATÉGIA DE CONTROLE DE <i>Duponchelia fovealis</i>	50
RESUMO	50
1. Introdução	50
2. Material e Métodos	52
2.1 Criação de <i>D. fovealis</i>	52
2.2 Isolados de <i>B. bassiana</i>	53
2.3 Preparo do inóculo	53
2.4 Viabilidade celular	54
2.5 Bioensaio de patogenicidade	54

2.6 Bioensaio de estimativa da concentração letal média, tempo letal médio e tempo médio de sobrevivência de <i>D. fovealis</i>	56
2.7 Avaliação de virulência em diferentes estágios imaturos de desenvolvimento de <i>D. fovealis</i>	57
2.7.1 Efeito dos isolados fúngicos na viabilidade dos ovos de <i>D. fovealis</i>	57
2.7.2 Efeito dos isolados fúngicos em lagartas de <i>D. fovealis</i>	57
2.7.3 Efeito dos isolados fúngicos na viabilidade das pupas de <i>D. fovealis</i>	58
2.8 Análise estatística	58
3. Resultados	59
3.1 Bioensaio de patogenicidade	59
3.2 Bioensaio de estimativa da concentração letal média, tempo letal médio e tempo médio de sobrevivência de <i>D. fovealis</i>	61
3.3 Avaliação de virulência em diferentes estágios imaturos de desenvolvimento de <i>D. fovealis</i>	63
3.3.1 Efeito dos isolados fúngicos na viabilidade dos ovos de <i>D. fovealis</i>	63
3.3.2 Efeito dos isolados fúngicos em lagartas de <i>D. fovealis</i>	64
3.3.3 Efeito dos isolados fúngicos na viabilidade das pupas de <i>D. fovealis</i>	65
4. Discussão.....	65
REFERÊNCIAS	71
CAPÍTULO 03 - POTENCIAL DE MICROBIOLÓGICOS COMERCIAIS COMO ESTRATÉGIA DE CONTROLE DE <i>Duponchelia fovealis</i>	77
RESUMO.....	77
1. Introdução	77
2. Material e Métodos.....	79
2.1 Criação de <i>D. fovealis</i>	79
2.2 Bioinseticidas	80
2.3 Viabilidade celular	80
2.4 Bioensaio de patogenicidade	82

2.5 Bioensaio de estimativa da concentração letal média, tempo letal médio e tempo médio de sobrevivência de <i>D. fovealis</i>	82
2.6 Avaliação de virulência em diferentes estágios larvais de <i>D. fovealis</i>	83
2.7 Análise estatística	84
3. Resultados	84
3.1 Bioensaio de patogenicidade	84
3.2 Bioensaio de estimativa da concentração letal média, tempo letal médio e tempo médio de sobrevivência de <i>D. fovealis</i>	86
3.3 Avaliação de virulência em diferentes estágios larvais de <i>D. fovealis</i>	88
4. Discussão	88
REFERÊNCIAS	94
CONCLUSÃO	101

INTRODUÇÃO GERAL

Produzido e apreciado em vários países, o morango é a fruta de pequeno porte com maior expressão econômica e em processo de expansão no Brasil (ANTUNES; JÚNIOR; SCHWENGBER, 2016; ANTUNES; BONOW; JUNIOR, 2020; ANTUNES et al., 2021). O Brasil ocupa a 17^a posição entre os maiores produtores de morango que aumenta a cada ano, sendo relatada uma área de plantio de 4,500 ha, com produção anual de 165,440 toneladas (FAO, 2020). A produção comercial do morango é feita em várias regiões do Brasil sendo o estado de Minas Gerais o principal produtor, seguido pelos estados do Rio Grande do Sul e Paraná (ANTUNES; JÚNIOR; SCHWENGBER, 2016; ANTUNES; BONOW; JUNIOR, 2020).

A ocorrência de pragas no morango está entre os problemas mais significativos relacionados à sua cultura (ZEIST; RESENDE, 2019). A lagarta-da-coroa do morango *Duponchelia fovealis* Zeller, nativa da região Mediterrânea e Ilhas Canárias, é considerada uma praga chave do morangueiro em países da Europa, Ásia, África e América (CABI, 2020; CRUZ-ESTEBAN; ROJAS, 2021). No Brasil, o inseto foi identificado no estado do Paraná, atacando folhas, flores, coroa e frutos da planta (ZAWADNEAK et al., 2016). Em altas incidências da praga, as plantas ficam enfraquecidas diminuindo drasticamente a produtividade, gerando prejuízos econômicos aos produtores (ZAWADNEAK; GONÇALVES; BISCHOFF, 2014; ZAWADNEAK et al., 2016).

Aplicações de inseticidas químicos tem contribuído para o controle de artrópodes no morangueiro, porém, seu uso indiscriminado leva ao acúmulo de resíduos tóxicos nos frutos e gera impacto ambiental bastante significativo (OSHITA; JARDIM, 2012; DE SILVA et al., 2019). Nesse contexto, o uso do controle biológico permite ao agricultor controlar insetos-praga a partir do uso de seus inimigos naturais de modo a minimizar o efeito negativo sobre o meio ambiente e sobre a saúde humana.

Nos últimos anos, estudos visando o controle biológico de *D. fovealis* foram realizados com microrganismos entomopatogênicos (AMATUZZI et al., 2018a, 2018b; POITEVIN et al., 2018; PETRUCCI et al., 2020). *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae* e *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) fazem parte do grupo de microrganismos mais empregados em

programas de controle biológico dos artrópodes (MASCARIN et al., 2019; SAMADA; TAMBUNAN, 2020).

Devido à necessidade em buscar medidas alternativas para o controle de *D. fovealis* e do efeito promissor de microrganismos entomopatogênicos no controle desta praga, a presente pesquisa objetivou avaliar o potencial entomopatogênico de isolados do fungo *B. bassiana* obtidos da Coleção Microbiológica da Rede Paranaense (CMRP/UFPR) - TAXonline e inseticidas biológicos comerciais no controle de *D. fovealis*.

Para organizar os diferentes tópicos abordados, esta dissertação apresenta-se em três capítulos, sendo o capítulo 1 uma revisão da literatura e os capítulos 2 e 3 com a etapa de seleção e bioensaios de patogenicidade dos isolados de fungos entomopatogênicos e produtos comerciais, respectivamente, no controle biológico de *D. fovealis*.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o potencial de fungos entomopatogênicos e de bioprodutos comerciais no controle biológico de *D. fovealis*.

Objetivos específicos

- Avaliar, sob condições de laboratório, a patogenicidade de isolados de *B. bassiana* obtidos da Coleção Microbiológica da Rede Paranaense - TAXonline (CMRP/UFPR) em lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*;
- Avaliar o efeito de inseticidas biológicos comerciais a base de *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *C. fumosorosea* e *Bt* no controle de lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis* em condições de laboratório;
- Avaliar a concentração letal média (CL₅₀), tempo letal médio (TL₅₀) e tempo médio de sobrevivência (TMS) dos isolados e dos produtos formulados que causaram taxas de mortalidade $\geq 80\%$ contra lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*;

- Avaliar a suscetibilidade de todos os estágios de desenvolvimento de *D. fovealis* na concentração letal média (CL₅₀) dos isolados e dos produtos formulados que causaram taxas de mortalidade ≥ 80%.

REFERÊNCIAS

AMATUZZI, R. F. et al. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to soil-borne entomopathogenic fungi. **Insects**, v. 9, n. 2, 2018a.

AMATUZZI, R. F. et al. Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera:Crambidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 3, p. 429–435, 2018b.

ANTUNES, L. E. C.; BONOW, S.; JUNIOR, REISSER. Morango crescimento constante em área e produção. **Embrapa Clima Temperado (CPACT)**, v. 37, n. 2316–6304, p. 88–92, 2020.

ANTUNES, L. E. C. et al. Morango produção aumenta ano a ano. **Anuário HF Campo e Negócio**, n. 2013, p. 1–4, 2021.

ANTUNES, L. E. C.; JÚNIOR, C. R.; SCHWENGBER, J. E. **Morangueiro**. 1. ed, 2016.

CABI. *Duponchelia fovealis* (**Southern European marshland pyralid**). Disponível em: < <https://www.cabi.org/isc/datasheet/20168>>. Acesso em: 17 de junho de 2022.

CRUZ-ESTEBAN, S.; ROJAS, J. C. Pheromone-Baited Traps Confirm the Presence of *Duponchelia fovealis* in Strawberry Crops in Mexico. **Southwestern Entomologist**, v. 46, n. 2, p. 533–536, 2021.

DE SILVA, N. I. et al. Use of endophytes as biocontrol agents. **Fungal Biology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 133–148, 2019.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/countryprofiles/index/en/?iso3=BRA>>. Acesso em: 25 de julho de 2022.

MASCARIN, G. M. et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 165, n. December 2017, p. 46–53, 2019.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 46–70, 2012.

PETRUCCI, K. P. O. S. et al. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae). **Nucleus**, v. 17, n. 1, p. 293–304, 2020.

POITEVIN, C. G. et al. Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 53, n. 3, p. 323–331, 2018.

SAMADA, L. H.; TAMBUNAN, U. S. F. Biopesticides as promising alternatives to chemical pesticides: A review of their current and future status. **OnLine Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 2, p. 66–76, 2020.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; BISCHOFF, A. *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae): nova praga no Brasil. **Universidade Federal do Paraná**, p. 19, 2014.

ZAWADNEAK, M. A. C. et al. First record of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia (Chile)**, v. 34, n. 3, p. 91–95, 2016.

ZEIST, AR; RESENDE, J. Strawberry breeding in Brazil: current momentum and perspectives. **Horticultura brasileira**, p. 7–16, 2019.

CAPÍTULO 1. REVISÃO DE LITERATURA

1. O morangueiro

O morangueiro pelo sistema de classificação vegetal de Cronquist (1998), é classificado taxonomicamente como Magnoliophyta (Angiosperma), Classe Magnoliopsita (Dicotiledônea), Subclasse Rosidae, Ordem Rosales, Família Rosaceae, Subfamília Rosoideae, onde encontra-se a principal espécie cultivada comercialmente *Fragaria × ananassa* Duchesne (PROCOPIUK, 2015). Este fruto, é um híbrido natural, resultante de um cruzamento entre duas espécies nativas da América, a espécie norte-americana *Fragaria virginiana* (L.) Duchesne e *Fragaria chiloensis* (L.) Duchesne, levadas à França (GRAHAM, 2005).

O morango é um pseudofruto carnoso formado a partir do engrossamento do receptáculo. Os frutos verdadeiros, normalmente confundidos com sementes, são do tipo aquênio. Essas pequenas estruturas compõem o pseudofruto de coloração avermelhada quando maduro e são encontrados presos ao longo da sua superfície. Além disso, esta planta apresenta um porte herbáceo, perene, podendo ser rasteira ou ereta (ANTUNES; JÚNIOR; SCHWENGBER, 2016). O vegetal apresenta um sistema radicular fasciculado e com raízes superficiais, caule semi-subterrâneo, conhecido como coroa. As folhas se originam da coroa, têm pecíolo longo e são trifoliadas. As flores são hermafroditas, com arranjo pentâmero e possuem uma coloração branca (MACHADO, 2016).

O cultivo dessa olerícola pode ser realizado através do sistema convencional ou orgânico. No Brasil, existem várias formas para o seu plantio: no solo, com ou sem uma cobertura plástica, em túneis baixos, em estufas, ou na água (sistema hidropônico), com ou sem substrato (ANTUNES; JÚNIOR; SCHWENGBER, 2016; MACHADO, 2016).

Com sua atraente coloração, aroma e sabor agradável, é uma das frutas de porte pequeno com grande expressão econômica e consumida em vários países (ANTUNES; JÚNIOR; SCHWENGBER, 2016). Em 2019, o México tornou-se o maior exportador de morangos do mundo ao ultrapassar a Espanha (FAO, 2020). No Brasil, o morango é um importante ativo da indústria de frutas

e sua produção foi incentivada pelo incremento de novos cultivares adaptados a diferentes climas (PAIVA et al., 2020). Segundo os últimos dados publicados pela organização *Food and Agriculture Organization of the United States* (FAO) em 2020, o Brasil ocupa a 17ª posição entre os maiores produtores de morango que aumenta a cada ano, sendo relatada uma área de plantio de 4,500 ha, com produção anual de 165,440 toneladas. No ano de 2020, os estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio Grande do Sul aumentaram significativamente a área de cultivo para o morango (ANTUNES et al., 2021).

A produção comercial do morango é feita em várias regiões do Brasil sendo o estado de Minas Gerais o principal produtor, seguido pelos estados do Rio Grande do Sul e Paraná (ANTUNES; JÚNIOR; SCHWENGBER, 2016; ANTUNES; BONOW; JUNIOR, 2020). No Paraná, de acordo com dados da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (SEAB), o morango é a terceira fruta em movimentação de capital na fruticultura do estado, com participação de 12,5% no total do Valor Bruto da Produção (VBP) do setor. O cultivo da fruta ocupa aproximadamente 905 ha, com produção de cerca de 32,9 mil toneladas sendo a Região Metropolitana de Curitiba a principal produtora do Estado (SEAB, 2021).

Para atender demandas mundiais no abastecimento de insumos agrícolas, projeções para as próximas décadas indicam que o rendimento da produção precisará ser dobrado (DE LA CRUZ QUIROZ et al., 2019). A incidência de pragas está entre os problemas mais importantes relacionados à cultura do morango no Brasil, que ocasionam grandes prejuízos econômicos aos produtores, e por tal razão requer a utilização de inseticidas químicos para minimizar os efeitos dos danos (MACHADO, 2016; ZEIST, 2019).

Dentre as pragas que afetam a produção de morangos no Brasil encontram-se as espécies *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), *Phytonemus pallidus* Banks (Acari: Tarsonemidae), *Aphis forbesi* Weed (Hemiptera: Aphididae), *Chaetosiphon fragaefolli* Cockerel (Hemiptera: Aphididae), *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), *Spodoptera eridania* Cramer (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae), *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae), *Lobiopa insularis* Castelnau (Coleoptera: Nitidulidae), *Naupactus tremolerasi* Hustache (Coleoptera: Curculionidae), *Spintherophyta semiaurata*

Klug (Coleoptera: Chrysomelidae), *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae), *Heliethrips haemorrhoidalis* Bouché (Thysanoptera: Thripidae), *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae), *Neopamera bilobata* Say (Hemiptera: Rhyparochromidae), *Atta* sp. (Hymenoptera: Formicidae), *Deroceras laeve* Müller (Stylommatophora: Agriolimacidae) e *Bradybaena similis* Férussac (Stylommatophora: Bradybaenidae) (EMBRAPA, 2010; ZAWADNEAK, 2011; BERNARDI; BOTTON; NAVA; ZAWADNEAK, 2015, DE SOUZA, 2021).

2. *Duponchelia fovealis* (Zeller, 1847)

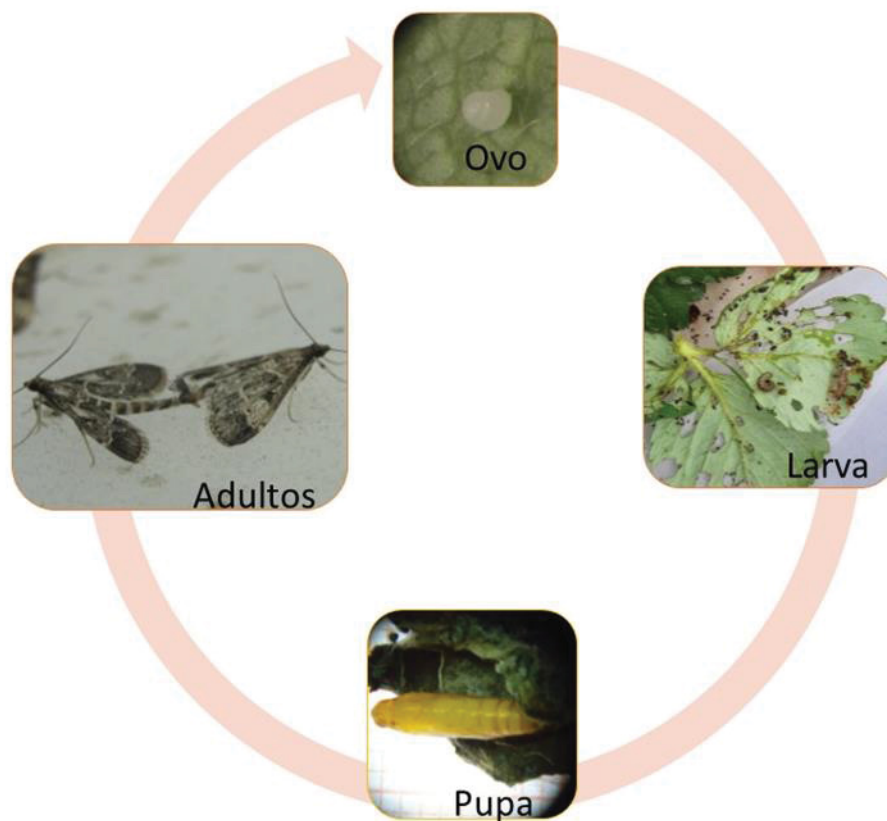
Popularmente reconhecida no Brasil como lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae), é uma micro-mariposa originária do sul da Europa e leste do Mediterrâneo, sendo considerada uma praga chave do morango em países da Europa, Ásia, África e América (CABI, 2020; CRUZ-ESTEBAN; ROJAS, 2021). A introdução de *D. fovealis* no Brasil e seu rápido estabelecimento em alguns estados como Paraná, Espírito Santo e Minas Gerais, têm causado prejuízos econômicos aos produtores de morango. Os danos associados à esta praga vão desde a destruição das folhas e coroa, até o ataque aos frutos diminuindo drasticamente a produtividade da cultura (BERNARDI; BOTTON; NAVA; ZAWADNEAK, 2015; PIROVANI et al., 2015; ZAWADNEAK et al., 2016).

Apesar de ainda não ser relatada no Brasil atacando outras espécies de vegetais além do morangueiro (ZAWADNEAK et al., 2016), *D. fovealis* é uma praga polífaga que se alimenta de importantes espécies ornamentais, como azaleia (*Rhododendron* spp.), begônia (*Begonia* spp.) e orquídea (*Phalaenopsis* spp.); plantas aquáticas cultivadas em estufas, como folhas ornamentais (*Hygrophila polysperma*) e outros gêneros agrícolas como pimentão (*Capsicum annuum*), beterraba (*Beta vulgaris*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), amora (*Rubus fruticosus*), tomate (*Solanum lycopersicum*), milho (*Zea mays*) (BRAMBILA; STOCKS, 2010; STOCKS; HODGES, 2013) e batata doce (*Ipomoea batatas*) (PUTNOKY-CSICSÓ et al., 2022).

Essa mariposa apresenta um desenvolvimento holometábolo (ovo - larva - pupa - adulto) (FIGURA 1) com variações nos períodos de duração conforme

as condições climáticas (SCHALL, 2005; PAES et al., 2018). Além do mais, a espécie apresenta um potencial de aumentar rapidamente a sua densidade populacional, visto que possui uma alta taxa reprodutiva ativa, com até duzentos ovos por fêmea, e um rápido desenvolvimento (ciclo de geração entre 6-8 semanas) (MOLNÁR et al., 2018).

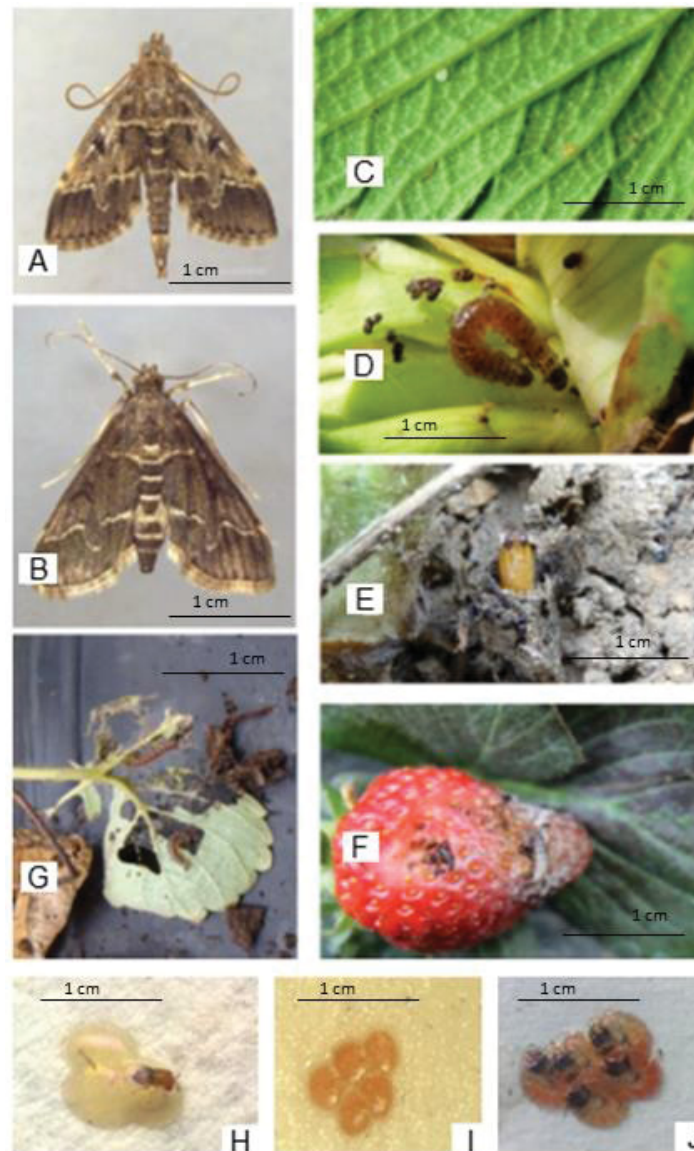
FIGURA 1 – FASES DO DESENVOLVIMENTO DE *Duponchelia fovealis*.



FONTE: ZAWADNEAK (2022).

Cada fêmea de *D. fovealis* deposita aproximadamente 200 ovos com cerca de 0,3 a 0,6 mm com a coloração creme logo após a oviposição, tornando-se avermelhados próximo da eclosão (FIGURA 2) (ZAWADNEAK et al., 2016, 2017). A envergadura do adulto é de cerca de 19 mm de asas e 10 mm de comprimento do corpo. Os machos possuem o abdome mais afilado e um tufo de pelos na extremidade, enquanto as fêmeas são menores e mais robustas (FIGURA 2) (ZAWADNEAK et al., 2016).

FIGURA 2 – FASES DO DESENVOLVIMENTO DE *Duponchelia fovealis*. A: MACHO; B: FÊMEA; C: OVOS; D: LAGARTA NO QUINTO ÍNSTAR DE DESENVOLVIMENTO; E: PUPAS; F E G: DANOS NO MORANGO, H: OVOS APÓS OVIPOSIÇÃO; I, J: OVOS PRÓXIMOS AO PERÍODO DE ECLOSÃO.



FONTE: ADAPTADO DE PIROVANI (2016); ZAWADNEAK et al., (2016).

As lagartas apresentam cinco estádios larvais com 20 mm de comprimento no último ínstar e a coloração do corpo pode variar de branco-creme a marrom-clara (ZAWADNEAK et al., 2016). As pupas encontram-se dentro de casulos com 9 -12 mm e são confeccionadas com teias, excrementos e partículas do solo, possuem coloração amarelada, tornando-se mais escura próxima à emergência dos adultos (STOCKS; HODGES, 2013). O período de ovo a adulto (25 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas) em dieta artificial é de 38 dias (ZAWADNEAK et al., 2017).

As lagartas desse inseto são ágeis e apresentam preferência alimentar pelas folhas localizadas próximas ao solo. Durante o ataque causam desfolha, prejudicando a fotossíntese, e conseqüentemente, diminuem a qualidade dos morangos, além de broquear a região da coroa o que compromete a circulação de nutrientes favorecendo a ação de fitopatógenos (ZAWADNEAK; GONÇALVES; BISCHOFF, 2014). Devido à presença de *D. fovealis* ao longo de todo o ciclo da cultura, esta praga apresenta um alto potencial de dano, sendo mais ativas nos dias mais quentes, onde o seu monitoramento é realizado por detecção visual de modo a verificar formas imaturas e sintomas de danos apresentado pelas plantas (SOUZA et al., 2013; ANTUNES; JÚNIOR; SCHWENGBER, 2016).

O manejo dessa praga é difícil, pois não há registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de produtos comerciais para o seu controle (AGROFIT, 2022). Nos últimos anos, estudos visando o controle biológico de *D. fovealis* estão sendo realizados utilizando fungos entomopatogênicos (AMATUZZI et al., 2018a, 2018b; POITEVIN et al., 2018) e *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (PETRUCCI et al., 2020). Nesse contexto, os agentes biológicos são importantes ferramentas para o controle das populações dessa praga agrícola em plantações de morango.

3. Uso de inseticidas sintéticos e seus impactos

O ataque de pragas em culturas agrícolas é um dos principais problemas fitossanitários na agricultura mundial e uso intensivo de agrotóxicos desempenha um papel importante no controle de pragas (CHOWAŃSKI et al., 2014). Agrotóxicos são substâncias químicas, físicas ou biológicas utilizadas nos setores de produção agrícola, ambientes florestais, pastagens, entre outros, com o objetivo de combater seres vivos considerados nocivos para a fauna e flora (BRASIL, 1989; BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

Entretanto, por possuírem longo período residual, a aplicação indiscriminada e recorrente desses produtos pode resultar no acúmulo de seus resíduos tóxicos em alimentos, solos e águas causando impactos ambientais significativos (OSHITA; JARDIM, 2012; DE SILVA et al., 2019). Os resíduos de inseticidas sintéticos permanecem retidos no ambiente por um longo período de

tempo, pois alguns desses compostos tendem a ficar acumulados nos diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar (CHOWAŃSKI et al., 2014).

Um dos problemas mais graves associados ao seu uso intensivo é o desenvolvimento da resistência por insetos-pragas (ZAKI et al., 2020). Tal processo pode acontecer por meio de mutações em determinados indivíduos de uma população, os quais se tornam menos suscetíveis a um determinado composto químico. A resistência de insetos aos inseticidas sintéticos pode ser explicada como a capacidade de alguns indivíduos da população da praga em sobreviver a doses do inseticida que é letal para a maioria dos indivíduos da população, além da capacidade de passar esse recurso para as gerações futuras (CHOWAŃSKI et al., 2014).

O uso de inseticidas químicos de amplo espectro pode afetar os inimigos naturais das pragas e causar a destruição de organismos benéficos para a agricultura, como os insetos polinizadores (BRITTAİN; POTTS, 2010; ZAKI et al., 2020; ARA, 2021). Esses impactos contribuem para o baixo rendimento das culturas e apresentam uma ameaça e risco para segurança alimentar (ARA, 2021).

Ademais, o uso incorreto de inseticidas sintéticos também apresenta efeito deletério na saúde do agricultor e repercutem no aspecto financeiro, por serem produtos com elevado custo monetário (MIDINGYI et al., 2018; ZAKI et al., 2020).

Em 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), criou o Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (PARA), com o objetivo de manter a segurança do alimento para o consumidor e a saúde do trabalhador rural. O Programa funciona a partir da coleta de amostras em pontos de venda pelas vigilâncias sanitárias dos estados e municípios brasileiros que enviam o material para os laboratórios de análise de resíduos de agrotóxicos (VEGRO; GONÇALVES; LEME, 2012).

A avaliação das análises dos resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal representativos da dieta da população paranaense, entre os anos de 2018 e 2019, revelou que 100% das amostras de morango analisadas apresentaram resíduos de agrotóxicos. Dessas análises, 57,14% apresentaram resultados insatisfatórios para os princípios ativos de agrotóxicos pesquisados perante a legislação brasileira. As amostras que apresentaram resultados

insatisfatórios também continham resíduos de agrotóxicos com o uso não autorizado para morango e são de uso proibido no Brasil (PARA/PR, 2020).

Sendo assim, entre as culturas alimentares mais reprovadas encontra-se o morango, que a duas décadas apresenta resultados insatisfatórios no PARA-MG, com tendência de crescimento, e foram classificadas com nível de risco crítico no estado do Paraná conforme último relatório publicado (LIMA, 2015; PARA/PR, 2020; RIBEIRO et al., 2021). Nesse panorama, houve uma mudança nos modos de consumo de alimentos, pois o consumidor exige a oferta de alimentos livres de agrotóxicos e mudanças nos métodos convencionais de produção (PIROVANI et al., 2015).

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) do morangueiro tem sido eficaz no combate de ameaças fitossanitárias e na promoção da sustentabilidade da produção de morangos. O MIP é um conjunto de medidas que visa manter as populações de pragas abaixo do nível de dano econômico. Dentre as ferramentas de controle encontram-se o manejo cultural, com ações preventivas como a destruição de restos de cultura anterior, o controle comportamental com utilização de feromônios e armadilhas, o controle varietal com o emprego de espécies de plantas transgênicas, o controle biológico com a utilização dos inimigos naturais de pragas e em último caso a utilização de produtos químicos seletivos que combatem somente as pragas-alvo (STENBERG, 2017; ZAWADNEAK et al., 2020). A integração das diferentes técnicas de controle do MIP favorece a volta do equilíbrio natural do meio ambiente que, por sua vez, aumenta a resistência biótica e evita que novas pragas se estabeleçam (STENBERG, 2017).

A Produção Integrada de Morango (PIMo) oferece alternativas ao sistema convencional de produção através do uso racional de agrotóxicos e da integração de práticas de manejo que estimula o equilíbrio do ecossistema e mantém a qualidade e a segurança dos produtos. É um programa coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), passível de certificação pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), e que conta com o apoio de instituições de pesquisa, ensino e extensão para o seu incremento (EMBRAPA, 2022). Este sistema garante maior transparência ao processo produtivo do morango ao criar um elo entre produtores e consumidores, através das auditorias a campo, e cria mecanismos

para rastreabilidade das etapas de produção. Essa comprovação torna-se cada vez mais importante no contexto atual, em que a segurança dos alimentos e a sustentabilidade na produção são fatores de competitividade das cadeias agrícolas (TORDIN, 2019).

Diante deste cenário, a busca por uma agricultura mais sustentável, com a utilização de ferramentas de manejo alternativo demonstram ser uma saída para o controle de pragas, onde o controle biológico configura-se como uma alternativa viável para o controle de insetos que causam prejuízos.

4. Biopesticidas

Produtos que contêm microrganismos, como bactérias, fungos e vírus, podem ser utilizados nas culturas como método de intervenção e prevenção de pragas agrícolas. A utilização de bioinseticidas na agricultura é crescente e está alinhada com princípios gerais do MIP (MATYJASZCZYK, 2015).

Os biopesticidas são formulações baseadas em agentes biológicos e estão entre as estratégias mais importantes do controle biológico de pragas agrícolas (DE LA CRUZ QUIROZ et al., 2019). O uso desses organismos como inimigos naturais de pragas é vantajoso para a segurança humana e organismos não-alvos, contribuindo também para a redução de resíduos de defensivos químicos no meio ambiente (MATYJASZCZYK, 2015). Além disso, o uso alternado de pesticidas microbianos e químicos podem reduzir o risco de desenvolvimento de resistência a inseticidas, pois inseticidas químicos enfraquecem o sistema imunológico dos insetos aumentando a chance de sucesso do produto biológico. O gerenciamento de métodos químicos e não químicos em pragas do morangueiro oferecem benefícios significativos no controle de pragas a longo prazo dentro do MIP (DARA et al., 2018).

A evolução comercial dos bioinseticidas microbianos é promissora e apresenta uma taxa de crescimento de 14,1% ao ano (DAMALAS; KOUTROUBAS, 2018; ZAKI et al., 2020). Até 2019, o Brasil apresentava 82 inseticidas microbianos registrados para o controle de pragas, distribuídos entre fungos (60%), bactérias (29%), baculovírus (10%) e nematoides (1%) (MASCARIN et al., 2019). Atualmente, o Brasil apresenta 235 inseticidas microbiológicos registrados (MAPA, 2022). No Brasil, a avaliação e o registro de

bioinseticidas é regulamentado pelo MAPA, pela ANVISA e pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), e representa um desafio para pequenas e médias empresas (OLIVEIRA-FILHO, 2008; DAMALAS; KOUTROUBAS, 2018; MASCARIN et al., 2019).

Os insumos agrícolas são regulados pela Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, a Lei de agrotóxicos e afins e seguem o Decreto nº 4.074, de 8 de janeiro de 2002, que estabelece o registro como uma condição para produção, manipulação, importação, exportação, comercialização, utilização dos produtos agrícolas e seus componentes em todo o território nacional (BRASIL, 1989; OLIVEIRA-FILHO, 2008).

Com o aumento da demanda global de produtos menos poluentes no meio agrícola e o incremento a comercialização de produtos a base de microrganismos entomopatogênicos, a partir de 1997, a legislação brasileira começa a se adequar aos padrões internacionais com a publicação da Portaria Normativa nº 131, de 3 de novembro de 1997 que preconiza a avaliação toxicológica e ecotoxicológica dos produtos biológicos (IBAMA, 1997; OLIVEIRA-FILHO, 2008). Além do mais, através da publicação da Instrução Normativa Conjunta nº 03, de 10 de março de 2006, entre MAPA, ANVISA e IBAMA, os critérios e exigências específicas para o registro de agentes microbiológicos de controle (AMCs), no Brasil foram definidos (BRASIL, 2006; OLIVEIRA-FILHO, 2008). Os requisitos para o registro incluem a avaliação da toxicidade e ecotoxicidade em três fases, além da avaliação da patogenicidade de agentes microbiológicos de controle, afim de garantir a segurança humana, animal e ambiental (MATYJASZCZYK, 2015; MASCARIN et al., 2019; ZAKI et al., 2020).

Contudo, por serem considerados de baixo impacto ambiental e baixa toxicidade, os produtos que tiverem em sua composição apenas elementos permitidos na legislação de orgânicos, têm tratamento diferenciado no processo de registro. Desde 2009, a legislação brasileira prevê que os defensivos biológicos podem seguir uma etapa mais ágil, conhecida como via dos orgânicos. Este tipo de registro é realizado com base na especificação de referência. Quando já existir a especificação e o produto em questão for compatível à esta, os estudos toxicológicos, ecotoxicológicos e a avaliação de patogenicidade são dispensados para o registro (ANVISA, 2022).

Apesar de possuir uma elevada biodiversidade de fungos entomopatogênicos, o Brasil apresenta apenas três espécies de fungos produzidas comercialmente (MASCARIN et al., 2019). O gênero *B. bassiana*, corresponde aproximadamente a 60% do mercado global de micopesticidas e o gênero *Metarhizium* sp. corresponde a 16% desse mercado. No entanto, os micopesticidas representam apenas 10% do mercado global de inseticidas microbianos, enquanto que mais de 75% correspondem aos bioinseticidas bacterianos (KUMAR; SINGH, 2015; ANEJA; KHAN; ANEJA, 2016; DAMALAS; KOUTROUBAS, 2018; MASCARIN et al., 2019).

Essa menor participação no mercado global dos micopesticidas está relacionado com a dificuldade na estabilidade de algumas formulações (ZAKI et al., 2020). Deste modo, uma alternativa a essa problemática é através do desenvolvimento de formulações melhoradas com compostos que protejam as estruturas fúngicas e garantam uma ação inseticida mais prolongada sobre o inseto alvo.

Buscando aprimorar tecnologias que são promissoras no controle de *D. fovealis*, avaliar sua suscetibilidade a produtos formulados comerciais é relevante pois resultados positivos com microrganismos entomopatogênicos em formulações comerciais poderá ampliar as recomendações para nova lista de pragas, de modo a viabilizar de maneira mais rápida seu uso por produtores de morango no controle dessa praga agrícola.

5. Controle biológico de pragas

Com a crescente demanda internacional pela redução da aplicação de inseticidas químicos no campo, novas estratégias que implementem o MIP devem ser exploradas. O MIP tem por objetivo o controle de pragas agrícolas utilizando um conjunto de medidas que reduzam a aplicação de defensivos químicos (STENBERG, 2017).

O controle biológico é um método de controle capaz de reduzir a densidade populacional e a capacidade de causar danos de uma determinada praga, a partir da utilização de seus inimigos naturais (STENBERG, 2017; FONTES, 2020). A Organização Internacional para o Controle Biológico (IOBC) é uma organização global independente dedicada à promoção de métodos

ambientalmente seguros de controle de insetos, ervas daninhas e doenças. Esta organização mostra, através de pesquisas, as evidências positivas do controle biológico e combate desinformações negativas sobre este método de controle (BARRATT et al., 2017).

Segundo os últimos dados publicados em 2019 da Associação Brasileira de Controle Biológico (ABCBio), o mercado de controle biológico deve apresentar uma taxa de 15 a 20% de crescimento nos próximos anos (MASCARIN et al., 2019). Nas últimas décadas, em países emergentes como o Brasil, a pesquisa e a implementação do controle biológico estão ganhando força devido as crescentes oportunidades educacionais na formação em entomologia. Além disso, o crescimento no mercado de exportação dos gêneros agrícolas, livres de inseticidas, do Brasil contribui para a necessidade de redução dos resíduos químicos em seus produtos agrícolas (PARRA, 2014; BARRATT et al., 2017).

Para o controle de pragas em ambientes agrícolas, seus inimigos naturais podem ser manejados ou inseridos no ambiente, permitindo assim, de forma alternativa ao uso dos agroquímicos, a produção de alimentos de forma mais sustentável e a conservação dos habitats naturais (FONTES, 2020). Os inimigos naturais de insetos são classificados em predadores, parasitoides e patógenos (STENBERG, 2017; FONTES, 2020).

Os fungos entomopatogênicos são patógenos naturais predominantes nas populações de artrópodes e possuem muitas características desejáveis que favorecem seu desenvolvimento como agentes de controle biológico (LACEY et al., 2015; ISLAM et al., 2021; SHARMA, R.; SHARMA, 2021). Estes entomopatógenos apresentam baixo risco para organismos não-alvos, como abelhas e minhocas, que são os principais provedores de serviços ecossistêmicos, e inimigos naturais de artrópodes, como vespas parasitas e besouros predadores (GOETTEL et al., 2001; TRAUOGOTT; WEISSTEINER; STRASSER, 2005; O'CALLAGHAN; BROWNBRIDGE, 2009; FONTES, 2020).

Outro patógeno desenvolvido comercialmente para o controle de insetos-praga é a bactéria entomopatogênica *Bt* (JOUZANI; VALIJANIAN; SHARAFI, 2017; DAMALAS; KOUTROUBAS, 2018). Esse entomopatógeno apresenta ação rápida, é fácil de reproduzir a um custo relativamente baixo, fáceis de formular, têm uma vida útil longa, são seletivos e com baixo risco de

impacto ambiental negativo (LACEY; SIEGEL, 2000; LACEY; MERRITT, 2003; E. BIRCH; BEGG; SQUIRE, 2011; LACEY et al., 2015).

Ao contrário dos pesticidas químicos, os microrganismos entomopatogênicos, por não apresentarem período de carência, são mais seguros para os aplicadores, consumo de alimentos e para o meio ambiente (LACEY; SIEGEL, 2000; LACEY; MERRITT, 2003; LACEY et al., 2015). A especificidade desses microrganismos minimizam os riscos de impactos em organismos benéficos e, por sua vez, favorecem a biodiversidade e o controle natural de insetos-praga por parasitoides e predadores (LACEY et al., 2015).

Deste modo, existe uma necessidade constante da realização de mais pesquisas com agentes de biocontrole e métodos de proteção para os insumos agrícolas contra produtos químicos e fatores ambientais de modo a reduzir o uso de pesticidas. O controle biológico é uma excelente oportunidade para essa estratégia onde o uso desses microrganismos apresentam vantagens econômicas e ambientais em relação ao uso de inseticidas.

5.1 Fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos são organismos capazes de colonizar diversas espécies de insetos usando-os como hospedeiros para desenvolver parte do seu ciclo de vida e causar epizootias (FONTES, 2020). A maioria dos gêneros fúngicos utilizados comercialmente nos programas de controle biológico pertencem ao filo Ascomycota e a ordem Hypocreales (MASCARIN et al., 2019; SHARMA, R.; SHARMA, 2021).

Esses entomopatógenos podem ser encontrados em ambientes aquáticos, florestais, agrícolas, urbanos e desérticos. Dos principais gêneros estudados, *Beauveria* e *Metarhizium* são encontrados em todos os tipos de ecossistemas, sendo *Beauveria* mais abundante em habitats naturais (ISLAM et al., 2021). Estes microrganismos podem ser isolados de amostras de solo, folhas e insetos, e a distribuição vai variar conforme a espécie (LACEY et al., 2015).

Os microrganismos entomopatogênicos ocupam uma grande variedade de nichos ecológicos (LACEY et al., 2015; SHARMA, R.; SHARMA, 2021). Algumas espécies de fungos podem colonizar tecidos vegetais como endófitos e trazer efeitos benéficos para as plantas hospedeiras, são antagonistas de

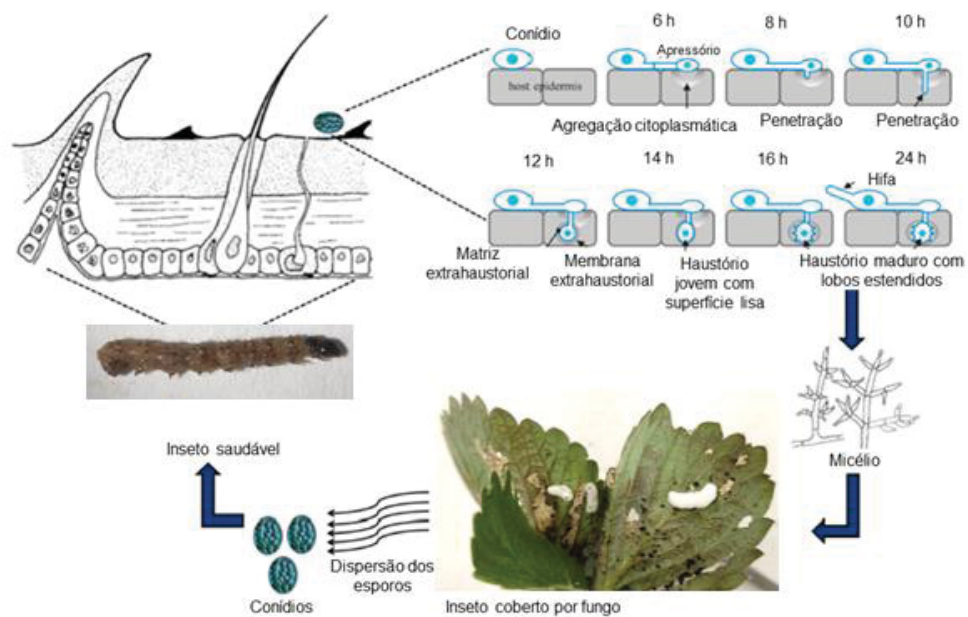
doenças de plantas, colonizadores da rizosfera e promotores do crescimento vegetal (GONZALEZ et al., 2016). Os esporos dos fungos também podem se dispersar por meio de correntes de vento ou respingos de chuva e através de insetos suscetíveis quando entram em contato com indivíduos infectados (WRAIGHT; RAMOS, 2002; MEYLING; EILENBERG, 2006a, 2006b; VEGA et al., 2007). Tais atributos biológicos possibilitam utilizar os fungos entomopatogênicos para uma variedade de artrópodes nocivos na agricultura.

Os gêneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria* são fungos entomopatogênicos anamórficos parasitários de diversas ordens de insetos. Estes gêneros fazem parte dos principais programas de controle microbiano no Brasil em várias culturas sendo utilizados principalmente no controle da mosca-branca (Hemiptera: Aleyrodidae), broca-do-café (Coleoptera: Scolytidae), percevejos (Hemiptera: Pentatomidae), psilídio (Hemiptera: Liviidae), gafanhotos (Orthoptera: Acrididae) e cigarrinhas (Hemiptera: Cercopidae) (MASCARIN et al., 2019).

Agentes de biocontrole fúngicos têm um modo único de infecção e são muito mais específicos. Esses microrganismos podem penetrar na cutícula do inseto e aumentar epizootias, diferentemente de bactérias e vírus que requerem ingestão para sua ação (LOHSE et al., 2015; ISLAM et al., 2021). *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria*, apresentam propriedades hidrofóbicas em seus conídios devido à presença de proteínas ricas em cisteína, chamadas hidrofobinas, na parede celular. A interação entre essas proteínas e os conídios fúngicos são primordiais para o início do processo infeccioso (SHARMA, R.; SHARMA, 2021).

Após o contato, o fungo infecta o hospedeiro através da penetração direta da cutícula ou por meio de orifícios naturais. O processo de patogênese começa com a adesão dos conídios hidrofóbicos na superfície serosa do inseto suscetível, seguido da formação do tubo germinativo e produção de enzimas extracelulares. Estas enzimas degradam a cutícula do inseto e ajudam o processo de penetração por pressão mecânica iniciado pelo apressório, que é uma estrutura especializada formada a partir do tubo germinativo. Uma vez dentro do inseto, o fungo se desenvolve através da hemocele, causando depleção de nutrientes, invasão de tecidos e órgãos ocasionando a morte do inseto. Uma vez morto, o fungo esporula e emerge, podendo infectar novos insetos (FIGURA 4) (ISLAM et al., 2021; SHARMA, R.; SHARMA, 2021).

FIGURA 3 – MECANISMO DE AÇÃO DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.



FONTE: Adaptada de ISLAM et al. (2021).

Diante disso, e por serem encontrados em diferentes ambientes, mais estudos de prospecção de novas linhagens são necessários e podem fornecer isolados de fungos com espectro de atividade ainda mais amplo em todas as fases de vida da praga.

5.2 *Bacillus thuringiensis*

Entre os agentes de controle microbiológicos encontra-se a bactéria entomopatogênica *Bt. Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva em forma de bastonete, patogênica das formas larvais de diferentes ordens de insetos, encontrada em uma diversidade de ecossistemas e pode ser facilmente isolada do ambiente (POLANCZYK; ALVES, 2003; PALMA et al., 2014; FERNÁNDEZ-CHAPA; RAMÍREZ-VILLALOBOS; GALÁN-WONG, 2019).

A espécie *Bt* apresenta diferentes subespécies e as mais utilizadas para o controle de inúmeras pragas de insetos são a *kurstaki*, *aizawai* e *israelenses* (LACEY et al., 2015; JOUZANI; VALIJANIA; SHARAFI, 2017; FERNÁNDEZ-CHAPA; RAMÍREZ-VILLALOBOS; GALÁN-WONG, 2019). Como principal característica, durante a esporulação, *Bt* sintetiza uma grande quantidade de proteínas denominadas delta-endotoxinas, com atividade inseticida a diversos grupos de insetos, que quando acumuladas formam um corpo de inclusão

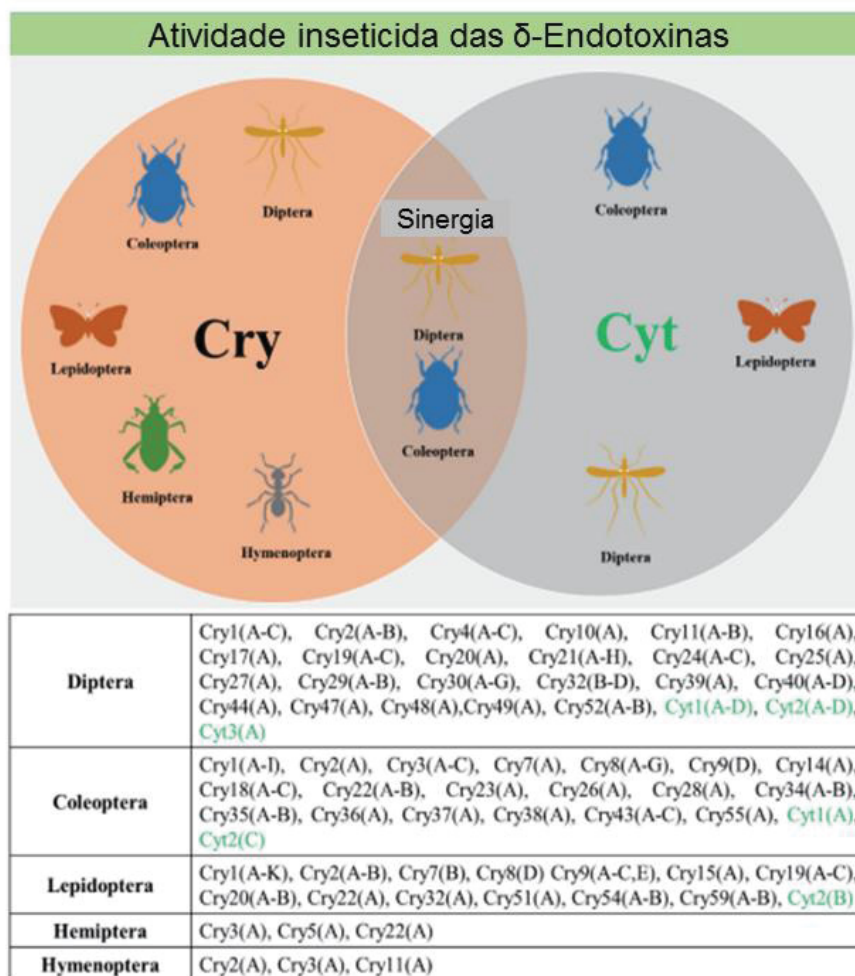
cristalina (PALMA et al., 2014). As endotoxinas são compostas por dois tipos de proteínas, Cry, com atividade inseticida específica, e Cyt, com atividade citolítica inespecífica (CORREA, 2012). Essas proteínas pertencem a classe das toxinas formadoras de poros (PFT), que quando secretadas como proteínas solúveis em água passam por mudanças conformacionais para conseguir se inserir ou translocar através das membranas celulares do hospedeiro (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; PALMA et al., 2014).

As proteínas Cry são codificadas por genes *cry*, que podem estar localizados no cromossomo ou em grandes plasmídios (ou em ambos), e inicialmente são sintetizadas na forma de protoxinas. A toxicidade está relacionada com a região N-terminal das cadeias polipeptídicas enquanto que a forma estrutural do cristal é determinada pela porção C-terminal. Podem apresentar as formas bipiramidal, redonda, cúbica e retangular, e quando observados através de exames microscópicos, podem fornecer indicações sobre a atividade inseticida das estirpes (POLANCZYK; ALVES, 2003).

Além das toxinas Cry, essas bactérias podem produzir outras endotoxinas durante a esporulação, as endotoxinas citolíticas (Cyt). As toxinas Cyt, diferente das toxinas Cry, não se ligam a receptores específicos nas membranas das células, mas diretamente aos lipídios da membrana celular. Esta ligação induz a formação de poros ou desestrutura a bicamada lipídica das membranas celulares ocasionando a morte dos insetos (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

As proteínas Cry são relatadas como tóxicas para Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Diptera, Orthoptera e Mallophaga, além de também ter ação contra nematóides, ácaros, alguns membros do filo Protozoa e algumas células cancerígenas (PALMA et al., 2014; FERNÁNDEZ-CHAPA; RAMÍREZ-VILLALOBOS; GALÁN-WONG, 2019). Algumas toxinas possuem um espectro de ação para mais de uma ordem de inseto e a combinação de toxinas presentes em uma linhagem define seu espectro de ação. Por outro lado, as toxinas Cyt possuem maior atividade contra dípteros e em menor frequência para alguns lepidópteros e coleópteros (FIGURA 5) (FERNÁNDEZ-CHAPA; RAMÍREZ-VILLALOBOS; GALÁN-WONG, 2019).

FIGURA 4 – ATIVIDADE INSETICIDA DAS DELTA-ENDOTOXINAS Cry e Cyt CONTRA AS ORDENS DIPTERA, COLEOPTERA, LEPIDOPTERA, HEMIPTERA E HYMENOPTERA.



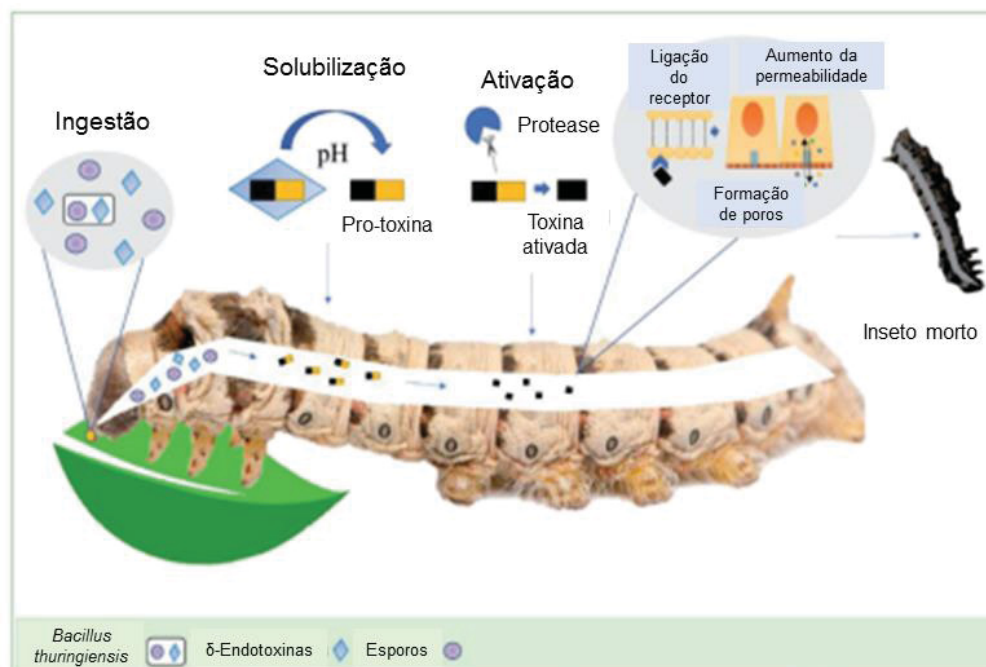
FONTE: FERNÁNDEZ-CHAPA; RAMÍREZ-VILLALOBOS; GALÁN-WONG (2019).

Outras toxinas, com ação inseticida, como α -exotoxinas, β -toxinas, Proteínas Inseticidas Vegetativas (VIPs) e Proteínas Inseticidas Secretadas (SIPs) também podem ser produzidas potencializando a toxicidade das delta-toxinas (POLANCZYK; ALVES, 2003; BRAVO et al., 2011; PALMA et al., 2014; FERNÁNDEZ-CHAPA; RAMÍREZ-VILLALOBOS; GALÁN-WONG, 2019).

De forma geral, após a ingestão do *Bt*, os cristais são solubilizados no pH alcalino do intestino médio do inseto liberando as protoxinas, estas são processadas por proteases presentes no intestino liberando o fragmento tóxico, a toxina Cry. As toxinas Cry atravessam a membrana peritrófica, ligam-se aos receptores específicos localizados nas microvilosidades das células colunares do intestino médio, sendo este um fator importante para a especificidade das delta-endotoxinas (POLANCZYK; ALVES, 2003; PALMA et al., 2014; FERNÁNDEZ-CHAPA; RAMÍREZ-VILLALOBOS; GALÁN-WONG, 2019).

Esse processo de ligação sequencial, interfere no gradiente iônico e no balanço osmótico das células, resultando na formação de poros que aumentam a permeabilidade da membrana. Devido ao aumento na absorção de água, a célula sofre lise, ocorre a desintegração do intestino médio, inanição e posterior septicemia levando o inseto a morte (FIGURA 6) (POLANCZYK; ALVES, 2003; PALMA et al., 2014). Os sintomas da intoxicação do inseto pela ingestão do *Bt* são a perda do apetite, regurgitação, diarreia, perda de mobilidade e paralisia em um período de 18 a 72 horas, o tegumento fica sem brilho e marrom escuro (MELATTI, 2008).

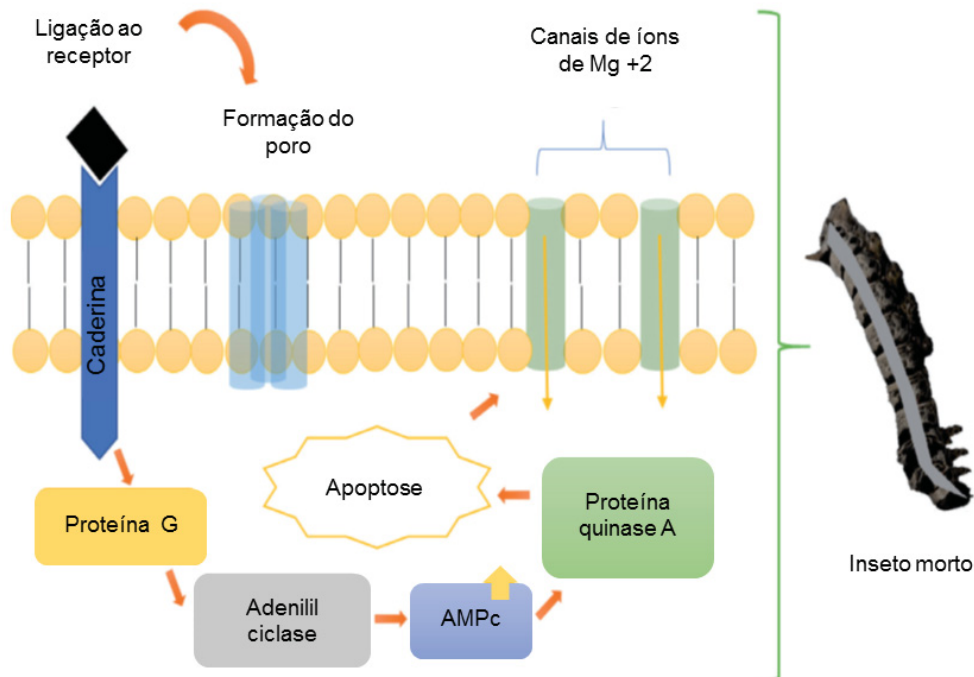
FIGURA 5 – MECANISMO DE AÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* PELA AÇÃO DE DELTA-ENDOTOXINAS Cry SEGUNDO O MODELO DE LIGAÇÃO SEQUENCIAL.



FONTE: FERNÁNDEZ-CHAPA; RAMÍREZ-VILLALOBOS; GALÁN-WONG (2019).

Outro mecanismo de ação, denominado via de sinalização, é proposto para a bactéria *Bt*. Neste modelo, após a produção de poros na membrana ocorrerá uma série de reações sucessivas devido a ligação das toxinas Cry aos receptores de caderina presentes na superfície da membrana celular. Essa ligação altera o metabolismo celular resultando na ativação da proteína quinase A que estimula a apoptose celular (FIGURA 7) (FERNÁNDEZ-CHAPA; RAMÍREZ-VILLALOBOS; GALÁN-WONG, 2019).

FIGURA 6 – MECANISMO DE AÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* PELA AÇÃO DE DELTA-ENDOTOXINAS Cry SEGUNDO O MODELO DE VIA DE SINALIZAÇÃO.



FONTE: FERNÁNDEZ-CHAPA; RAMÍREZ-VILLALOBOS; GALÁN-WONG (2019).

A bactéria *Bt* tem maior eficiência quando aplicada nos primeiros estágios larvais devido ao pH alcalino do intestino do inseto que se torna ácido nos ínstares mais avançados (PETRUCCI et al., 2020).

A principal vantagem do uso desse microrganismo está relacionada com a atividade específica das toxinas para os insetos suscetíveis e por conta disso é classificada pelo MAPA como pouco perigosa ao meio ambiente e improvável de causar dano agudo aos aplicadores (LIMA, 2010). Sendo assim, *Bt* tem se mostrado eficiente no controle de insetos, reduzindo o uso excessivo de inseticidas químicos prejudiciais ao meio ambiente e a saúde do agricultor.

6. Alternativas para o manejo de *Duponchelia fovealis*

Em países da Europa e nos Estados Unidos, tem sido empregado para o controle de diversas espécies de pragas diferentes técnicas de manejo, como: comportamental, mecânico, cultural, químico e biológico (FIGURA 3) (BRAMBILA; STOCKS, 2010; STOCKS; HODGES, 2013).

FIGURA 7 – FASES DO DESENVOLVIMENTO DE *Duponchelia fovealis* COM POSSÍVEIS MÉTODOS DE MANEJO DE ACORDO COM O ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO DA PRAGA.



FONTE: ZAWADNEAK (2014).

Em alguns países da Europa, para o controle comportamental de *D. fovealis*, são empregadas armadilhas de feromônio sexual (WITZGALL; KIRSCH; CORK, 2010). Um estudo recente identificou a composição química dos feromônios sexuais de fêmeas de *D. fovealis* e constatou que os compostos presentes podem ser utilizados em uma estratégia de monitoramento para atrair machos em condições de estufa e colaborar na interrupção do acasalamento quando misturados adequadamente com outros feromônios (MOLNÁR et al., 2018).

Já o controle mecânico é possível de se aplicar no plantio do morango em túnel baixo através da construção de barreiras, catação manual ou destruição direta da praga, pois o agricultor pode observar os sintomas fazendo uma caminhada diária pelos canteiros de cultivo (PIROVANI, 2016).

No controle cultural realizar práticas como limpeza das plantas ou retirar restos de vegetais em decomposição que também podem servir como fonte de alimento ou abrigo, além da eliminação dos cultivos abandonados, quebram o

ciclo da *D. fovealis* e desfavorecem o seu desenvolvimento (BRAMBILA; STOCKS, 2010; GILL, 2013; STOCKS; HODGES, 2013).

Apesar de não haver registro de inseticidas destinados ao controle desta praga no Brasil, em outros países são empregados inseticidas como o espinosade, seletivo a inimigos naturais, bifentrina, fluvalinato, deltametrina, esfenvalerato, acefato e lambda-cialotrina, que são de amplo espectro, causando a mortalidade em até 75% (BETHKE; VANDER MEY, 2010). Estudo recentes no Brasil mostraram que os inseticidas clorfenapir, indoxacarbe e lambda-cialotrina + clorantraniliprole causaram níveis de mortalidade de lagartas de *D. fovealis* variando de 70,9 a 100,0%, podendo ser considerados como uma estratégia de controle químico para o manejo desta praga (SANTOS et al., 2019).

Quanto ao emprego do controle biológico em *D. fovealis*, estudos em laboratório demonstraram que a liberação de inimigos naturais, como do gênero *Cotesia* (Hymenoptera: Braconidae) e *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), parasitóides de fase larval e de ovos, respectivamente, tornam-se uma alternativa eficaz no controle da praga (PIROVANI, 2016; SANTOS et al., 2019; ARAUJO et al., 2020). Entretanto, estudos de seleção e avaliação do potencial de diferentes microrganismos isolados do solo e de insetos em cultivos de morango, identificaram novos isolados de *B. bassiana* como agente controlador de lagartas de *D. fovealis* (AMATUZZI et al., 2018a; POITEVIN et al., 2018). Outros isolados eficientes de *Paecilomyces lilacinus* também foram obtidos de folhas de morango e demonstraram em laboratório potencial patogênico contra as lagartas da praga (AMATUZZI et al., 2018b). Todavia, pesquisas recentes sobre infecções por *B. bassiana* mostraram que embora o fungo controle de forma efetiva lagartas e pupas, ele não foi eficaz nos ovos de *D. fovealis* (BAJA et al., 2020).

A bactéria entomopatogênica *Bt* tem mostrado resultados promissores em outros países onde *D. fovealis* está presente e estudos adicionais fornecerão informações sobre a suscetibilidade desta praga a novos isolados de *Bt* aumentando o espectro de atividade dessa bactéria (POLANCZYK; ALVES, 2003; VIANA et al., 2009; PETRUCCI et al., 2020).

Realizar a integração das diferentes formas de manejo mantém as populações de pragas em níveis baixos e auxilia na melhor escolha de controle de acordo com a situação ou momento evitando assim o uso exarcebado de

pesticidas, responsável por muitos problemas no meio agrícola. A busca por uma agricultura sustentável e uma maior preocupação com o meio ambiente exige mudanças nos métodos convencionais de produção sendo o controle biológico de *D. fovealis* uma alternativa viável.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. **AGROFIT — Português (Brasil)**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>>. Acesso em: 8 set. 2021.
- AMATUZZI, R. F. et al. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to soil-borne entomopathogenic fungi. **Insects**, v. 9, n. 2, 2018a.
- AMATUZZI, R. F. et al. Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera:Crambidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 3, p. 429–435, 2018b.
- ANEJA, K. R.; KHAN, S. A.; ANEJA, A. Biopesticides an eco-friendly pest management approach in agriculture: status and prospects. **Kavaka**, v. 154, p. 145–154, 2016.
- ANTUNES, L. E. C.; BONOW, S.; JUNIOR, R. Morango crescimento constante em área e produção. **Embrapa Clima Temperado (CPACT)**, v. 37, n. 2316–6304, p. 88–92, 2020.
- ANTUNES, L. E. C. et al. Morango produção aumenta ano a ano. **Anuário HF Campo e Negócio**, n. 2013, p. 1–4, 2021.
- ANTUNES, L. E. C.; JÚNIOR, C. R.; SCHWENGBER, J. E. **Morangueiro**. 1. ed, 2016.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA Plano Plurianual 2017-2020 – Ciclo 2017/2018**, p. ABNT, 2019.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/registro-de-produtos-biologicos>>. Acesso em: 10 set. 2022.
- ARA, Z. G.; HAQUE, A. R. A Comprehensive Review on Synthetic Insecticides: Toxicity to Pollinators, Associated Risk to Food Security, and Management Approaches. **Journal of Biosystems Engineering**, v. 46, n. 3, p. 254–272, 2021.
- ARAUJO, E. S. et al. Compatibility between entomopathogenic fungi and egg

parasitoids (Trichogrammatidae): A laboratory study for their combined use to control *Duponchelia fovealis*. **Insects**, v. 11, n. 9, p. 1–14, 2020.

BAJA, F. et al. Infection of *Beauveria bassiana* and *Cordyceps javanica* on different immature stages of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). **Crop Protection**, v. 138, n. June, 2020.

BARRATT, B. I. P.; MORAN, V. C.; BIGLER, F.; LENTEREN, J. C. V. The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. **BioControl**, v. 63, p. 155–167, 2017.

BERNARDI, D.; BOTTON, M.; NAVA, D.; ZAWADNEAK, M. A. C. Guia para a identificação e monitoramento de pragas e seus inimigos naturais em morangueiro. **Embrapa**, 2015.

BETHKE, J. A.; VANDER MEY, B. Pest Alert *Duponchelia fovealis*. **University of California Cooperative Extension San Diego**, n. June, p. 2–3, 2010.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 1, p. 10–15, 2012.

BRAMBILA, J.; STOCKS, I. The European pepper moth, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a Mediterranean pest moth discovered in central Florida. **Pest Alert DACS-P-01752, Florida Dept. of Agric. and Consumer Services, Div. Plant Industry**, n. December 2016, p. 1–4, 2010.

BRASIL. LEI Nº 7.802, DE 11 DE JULHO DE 1989. Regulamento. p. 1–7, 1989.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA CONJUNTA Nº 03, de 10 de Março de 2006 O. p. 5–65, 2006.

BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423–431, 2011.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423–435, 2007.

BRITTAIN, C.; POTTS, S. G. The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. **Basic and applied ecology**, 2010.

CABI. *Duponchelia fovealis* (Southern European marshland pyralid). Disponível em: <<https://www.cabi.org/isc/datasheet/20168>>. Acesso em: 2 fev. 2022.

CHOWAŃSKI, S. et al. Synthetic insecticides - Is there an alternative?. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 23, n. 2, p. 291–302, 2014.

CORREA, R. F. T. **Avaliação da toxicidade de proteínas Cry e Cyt de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* para diferentes linhagens de células de inseto e de mamífero**. 127 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) –

Departamento de Biologia celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

CRUZ-ESTEBAN, S.; ROJAS, J. C. Pheromone-Baited Traps Confirm the Presence of *Duponchelia fovealis* in Strawberry Crops in Mexico. **Southwestern Entomologist**, v. 46, n. 2, p. 533–536, 2021.

DAMALAS, C. A.; KOUTROUBAS, S. D. Current Status and Recent Developments in Biopesticide Use. **Agriculture**, v. 8, n. 13, 2018.

DARA, S. K., PECK, D., MURRAY, D. Chemical and non-chemical options for managing twospotted spider mite, western tarnished plant bug and other arthropod pests in strawberries. **Insects** v. 9, n. 10, 2018.

DE LA CRUZ QUIROZ, R. et al. Fungi-based biopesticides: shelf-life preservation technologies used in commercial products. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 3, p. 1003–1015, 2019.

DE SILVA, N. I. et al. Use of endophytes as biocontrol agents. **Fungal Biology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 133–148, 2019.

DE SOUZA, M. T.; DE SOUZA, M. T.; ZAWADNEAK, M. A. C. Biology and life table parameters of the *Heliothrips haemorrhoidalis* on strawberries. **Phytoparasitica**, v. 50, n. 1, p. 35–41, 2021.

E. BIRCH, A. N.; BEGG, G. S.; SQUIRE, G. R. How agro-ecological research helps to address food security issues under new IPM and pesticide reduction policies for global crop production systems. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 10, p. 3251–3261, 2011.

EMBRAPA Meio Ambiente – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/6121/producao-integrada-de-morango>>. Acesso em: 16 set. 2022.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/countryprofiles/index/en/?iso3=BRA>>. Acesso em: 02 jul. 2022.

FERNÁNDEZ-CHAPA, D.; RAMÍREZ-VILLALOBOS, J.; GALÁN-WONG, L. Toxic Potential of *Bacillus thuringiensis*: An Overview. **Protecting Rice Grains in the Post-Genomic Era**, p. 1–22, 2019.

FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. Controle biológico de pragas agrícolas. **Embrapa**, v. 148, 2020.

GILL, S. Another Invasive Species in Maryland: The European Pepper Moth. 2013.

GOETTEL, M. S. et al. Safety of fungal biocontrol agents. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. **Safety of Fungal Biocontrol Agents**, n. 2000, p. 347–375, 2001.

GONZALEZ, F. et al. New opportunities for the integration of microorganisms into biological pest control systems in greenhouse crops. **Journal of Pest Science**, v. 89, n. 2, p. 295–311, 2016.

GRAHAM, J. *Fragaria Strawberry*. **Biotechnology in agriculture series**, p. 456–474, 2005.

GUIMARÃES, J. A.; FILHO, M. M.; RIBEIRO, M. G. P. M.; JUNQUEIRA, A. M. R.; LIZ, R. S. Descrição e manejo das principais pragas do morangueiro. **Embrapa Hortaliças**. 1. ed, 2010.

IBAMA. PORTARIA NORMATIVA Nº 131, DE 3 DE NOVEMBRO DE 1997. p. 3–5, 1997.

ISLAM, W. et al. Insect-fungal-interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests. **Microbial Pathogenesis**, v. 159, n. March, p. 105122, 2021.

JOUZANI, G. S.; VALIJANIAN, E.; SHARAFI, R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidigs. **Microbial Biotechnol**, v. 101, p. 2691–2711, 2017.

KUMAR, S.; SINGH, A. Biopesticides: Present Status and the Future Prospects. **Journal of Fertilizers & Pesticides**, v. 06, n. 02, 2015.

LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1–41, 2015.

LACEY, L. A.; SIEGEL, J. P. Safety and ecotoxicology of entomopathogenic bacteria. **Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application**, p. 253–273, 2000.

LACEY, L. A.; MERRITT, R. W. The safety of bacterial microbial agents used for black fly and mosquito. **Environmental Impacts of Microbial Insecticides**, p. 151–168, 2003.

LIMA, G. M. S. Proteínas bioinseticidas produzidas por *Bacillus thuringiensis*. **Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 7, p. 119–137, 2010.

LIMA, M. A. Qualidade de morango quanto à segurança. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 0, n. 0, p. 50–54, 2015.

LOHSE, R. et al. Evaluation of new fermentation and formulation strategies for a high endophytic establishment of *Beauveria bassiana* in oilseed rape plants. **Biological Control**, v. 88, p. 26–36, 2015.

MACHADO, J. Strawberry cultivation in Brazil. **Revista Geama**, v. 2, n. 3, p. 230–238, 2016.

MAPA. **MAPA Indicadores**. Disponível em: <<https://indicadores.agricultura.gov.br/agrofit/index.htm>>. Acesso em: 28 jun. 2022.

MASCARIN, G. M. et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 165, n. December 2017, p. 46–53, 2019.

MATYJASZCZYK, E. Products containing microorganisms as a tool in integrated pest management and the rules of their market placement in the European Union. **Pest Management Science**, v. 71, n. 9, p. 1201–1206, 2015.

MELATTI, V. M. **Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*)**. 120 f. Projeto de Dissertação (Mestrado em Ciências agrárias) – Agronomia e medicina veterinária, Universidade de Brasília, Brasília/DF, 2008.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. **Mycological Research**, v. 110, n. 2, p. 188–195, 2006a.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 113, n. 1–4, p. 336–341, 2006b.

MIDINGOYI, S. G. et al. Do farmers and the Environment Benefit from Adopting Integrated Pest Management Practices? Evidence from Kenya. **Journal of Agricultural Economics**. 2018.

MOLNÁR, P. B. et al. Identification of the Female-Produced Sex Pheromone of an Invasive Greenhouse Pest, the European Pepper Moth (*Duponchelia fovealis*). **Journal of Chemical Ecology**, v. 44, n. 3, p. 257–267, 2018.

O'CALLAGHAN, M.; BROWNBRIDGE, M. Use of Microbes for Control and Eradication of Invasive Arthropods. **Springer**, v. 6, 2009.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. Avaliação da Periculosidade Ambiental de Bioinseticidas como uma Nova Perspectiva para a Ecotoxicologia no Brasil. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2008.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 46–70, 2012.

PAES, J. P. P. et al. Thermal requirements, development and number of generations of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 2447–2457, 2018.

PAIVA, K. D. et al. *Ascophyllum Nodosum* seaweed extract as an alternative for control of post-harvest soft rot in strawberries. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 13532–13543, 2020.

PALMA, L. et al. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An overview of their biocidal activity, 2014.

PARA/PR. RELATÓRIO PARA/PR Resultado do Ciclo 2018-2019. 2020.

PARRA, J. R. P. Biological control in Brazil: An overview. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 5, p. 420–429, 2014.

PETRUCCI, K. P. O. S. et al. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae). **Nucleus**, v. 17, n. 1, p. 293–304, 2020.

PIROVANI, V. D. et al. Manejo de Pragas para Cultura do Morangueiro : Sem Resíduo de Agrotóxicos. v. 1847, n. August, p. 64, 2015.

PIROVANI, V. D. **Métodos de manejo para *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) na cultura do morangueiro**. 113 f. Tese (Doutorado em Produção vegetal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2016.

POITEVIN, C. G. et al. Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 53, n. 3, p. 323–331, 2018.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma Breve Revisão. **Agrociencia**, v. 7, n. 2, p. 1–10, 2003.

PROCOPIUK, M. **Desempenho de dois cultivares de morangueiro em sistema orgânico sob dois tipos de túneis**. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

PUTNOKY-CSICSÓ, B. et al. Entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (strain NCAIM 362) effects on soil inhabiting *Melolontha melolontha* (Coleoptera) and *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera) larvae in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). **Plant Protection Science**, v. 58, n. 3, p. 264–268, 2022.

RIBEIRO, M. C. et al. Avaliação e monitoramento dos níveis de contaminação por resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal comercializados no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e44610212802, 2021.

SANTOS, F. M. et al. Toxicity of Insecticides in *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a New Strawberry Pest in Brazil under Laboratory Conditions. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 39, n. 5, p. 1–7, 2019.

SCHALL, R. *Duponchelia fovealis* Zeller: *Duponchelia*. **UF/IFAS Pest Alert.**, n. 919, p. 7, 2005.

SEAB. **Secretaria da Agricultura e do Abastecimento**. Disponível em: <<https://www.agricultura.pr.gov.br/>>. Acesso em: 8 set. 2021.

SHARMA, R.; SHARMA, P. **Fungal entomopathogens review**, 2021.

SOUZA, J. C. et al. Ocorrência de nova praga nas lavouras de morango no Sul de Minas. **EPAMIG. Circular Técnica**, n.180, n. 31, p. 5, 2013.

STENBERG, J. A. A Conceptual Framework for Integrated Pest Management. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 9, p. 759–769, 2017.

STOCKS, S. D.; HODGES, A. European Pepper Moth or Southern European Marsh Pyralid *Duponchelia fovealis* (Zeller). **Department of Entomology and Nematology; UF/IFAS Extension, Gainesville, FL 32611. Document EENY-508**, p. 10, 2013.

TORDIN, C. Produção integrada de morango agrega valor à fruta. **Revista cultivar**, Rio grande do Sul, 04 junho 2019. Disponível em: <<https://revistacultivar.com.br/noticias/producao-integrada-de-morango-agrega-valor-a-fruta>>. Acesso em: 16 set. 2022.

TRAUGOTT, M.; WEISSTEINER, S.; STRASSER, H. Effects of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii* on the non-target predator *Poecilus versicolor* (Coleoptera: Carabidae). **Biological Control**, v. 33, n. 1, p. 107–112, 2005.

VEGA, F. E. et al. Dissemination of Beneficial Microbial Agents by Insects. **Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**, p. 153–177, 2007.

VEGRO, C. L. R.; GONÇALVES, J. S.; LEME, P. H. C. Café para o capital. p. 1–2, 2012.

VIANA, C. L. T. et al. Efeito de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner em *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) Effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner new strains against *Plutella xylostella*. **Biologia**, n. January, p. 22–31, 2009.

WITZGALL, P.; KIRSCH, P.; CORK, A. Sex pheromones and their impact on pest management. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 1, p. 80–100, 2010.

ZAKI, O. et al. Limiting factors of mycopesticide development. **Biological Control**, v. 144, n. 2, p. 104220, 2020.

ZAWADNEAK, M. A. C.; ROSADO NETO, G. H.; SCHUBER, J. M.; PARCHEN, H. A. First Record of *Spintherophyta semiaurata* (Klug) (Coleoptera: Chrysomelidae) Damaging Strawberry Flowers. **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 3, p. 407–408, 2011.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; BISCHOFF, A. *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae): nova praga no Brasil. **Universidade Federal do Paraná**, p. 19, 2014.

ZAWADNEAK, M. A. C. et al. First record of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia (Chile)**, v. 34, n. 3, p. 91–95, 2016.

ZAWADNEAK, M. A. C. et al. Biological parameters of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) reared in the laboratory on two diets. **European Journal of Entomology**, v. 114, n. 3, p. 291–294, 2017.

ZAWADNEAK, M. A. C.; REINHARDT, V.; ROSA, J. M.; DE SOUZA, M. T.; DE

SOUZA, M. T. Manejo integrado de pragas do morangueiro. **Senar AR/PR**, v. 01, p. 74, 2020.

ZEIST. Strawberry breeding in Brazil: current momentum and perspectives. **Horticultura brasileira**, p. 7–16, 2019.

CAPÍTULO 02 – POTENCIAL DE ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COMO ESTRATÉGIA DE CONTROLE DE *Duponchelia fovealis*

RESUMO

Duponchelia fovealis é uma praga exótica que gera grandes prejuízos ao morangueiro em diversas regiões produtoras do mundo. Não há método de controle bem estabelecido, e a utilização de fungos entomopatogênicos vem se mostrando uma alternativa viável para o manejo da praga. O objetivo deste capítulo foi avaliar a patogenicidade e virulência de fungos entomopatogênicos contra ovos, lagartas e pupas de *D. fovealis*, em condições de laboratório. A avaliação da patogenicidade foi realizada com nove isolados de *Beauveria bassiana* na concentração de 10^9 conídios/mL contra lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*. Em seguida, a concentração letal (CL_{50}), tempo letal (TL_{50}), tempo médio de sobrevivência (TMS) e susceptibilidade dos demais estágios imaturos foram determinados para os isolados mais patogênicos. Os isolados mais virulentos foram 4485 e 4488 apresentando mortalidade superior a 80%, com valores de CL_{50} de $1,7 \times 10^7$ e $3,3 \times 10^6$ conídios/mL e valores de TL_{50} de 145,20 e 143,52 h, respectivamente. O tempo médio de sobrevivência das lagartas de terceiro ínstar quando submetidas ao isolado 4485 foi inferior ao isolado 4488, 106,56 e 121,53 h, respectivamente. Esses isolados apresentaram mortalidade superior a 50% nos primeiros estágios larvais de desenvolvimento quando submetidas a concentração da CL_{50} . Para o teste com ovos houve uma redução para 8,31% pelo isolado 4485 e 6,74% para o isolado 4488. A taxa de controle para as pupas foi de 32% pelo isolado 4485 e 33% para o isolado 4488. Nossos resultados demonstram que os isolados 4485 e 4488 de *B. bassiana* podem ser uma estratégia de manejo viável para o controle de *D. fovealis*.

Palavras-chave: *Fragaria* × *ananassa*; *Beauveria bassiana*; Controle biológico; Lagarta-da-coroa.

1. Introdução

A lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) é polífaga, com mais de 35 plantas hospedeiras conhecidas e trata-se de uma praga agrícola relevante, pois ataca a coroa, folhas, flores e frutos da cultura do morango (SOUZA et al., 2013; STOCKS; HODGES, 2013; ZAWADNEAK; GONÇALVES; BISCHOFF, 2014; ZAWADNEAK et al., 2016; ZAWADNEAK et al., 2019). Em casos de infestação severa, as plantas ficam debilitadas devido ao comprometimento da circulação de nutrientes e aumenta-se o risco de exposição a fitopatógenos resultando na morte da muda (STOCKS;

HODGES, 2013; ZAWADNEAK; GONÇALVES; BISCHOFF, 2014; ZAWADNEAK et al., 2016).

O inseto foi identificado pela primeira vez no Brasil em 2010, no estado do Paraná. Entretanto, ainda há uma carência de métodos de manejo que sejam eficientes (ZAWADNEAK; GONÇALVES; BISCHOFF, 2014; ZAWADNEAK et al., 2016; ARAUJO et al., 2021). Seu controle é dificultado devido ao hábito críptico das lagartas que permanecem abrigadas em partes protegidas da planta, consumindo preferencialmente as folhas localizadas próximas ao solo úmido (BRAMBILA; STOCKS, 2010; ZAWADNEAK et al., 2016). Diante do uso intensivo de inseticidas sintéticos na produção de morango no Brasil, que induz a seleção de espécies resistentes, contaminação ambiental e humana, o controle biológico demonstra ser uma importante ferramenta a ser empregada dentro de um programa de manejo integrado (OSHITA; JARDIM, 2012; DE SILVA et al., 2019; ZAKI et al., 2020).

Os fungos entomopatogênicos são patógenos naturais que ocorrem em populações de artrópodes, e podem provocar epizootias, o que indica o potencial desses microrganismos no controle de insetos pragas (LACEY; SIEGEL, 2000; LACEY; MERRITT, 2003; LACEY et al., 2015). Esses microrganismos podem persistir no ambiente aumentando as chances de infecções nos insetos. Os fatores comportamentais de *D. fovealis* podem influenciar na atividade do patógeno e estes devem ser ecologicamente competentes para funcionar e persistir no ambiente da praga alvo (LACEY et al., 2015). Desta forma, o uso de fungos entomopatogênicos é uma alternativa viável e segura para o manejo de *D. fovealis* e têm se mostrado eficiente na diminuição da população dessa praga em laboratório e em casa de vegetação (AMATUZZI et al., 2018a, 2018b; POITEVIN et al., 2018; BAJA et al., 2020).

Entre os fungos entomopatogênicos utilizados em programas de controle biológico, a espécie *B. bassiana* pertence à classe Sordariomycetes e é caracterizada por colônias brancas a amareladas (FONTES, 2020). Os conídios são hialinos, ovoides e encontra-se aglomerados (ZIMMERMANN, 2007; RODRIGUES et al., 2016). Este entomopatógeno que é largamente utilizado como bioinseticida na agricultura, apresenta uma distribuição cosmopolita, podendo ser isolado do solo, rizosfera de plantas e artrópodes (RODRIGUES et al., 2016).

Pesquisas recentes demonstram que isolados de *B. bassiana* apresentaram forte ação inseticida sobre lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis* (AMATUZZI et al., 2018a; POITEVIN et al., 2018). Porém, uma característica desejável dos entomopatógenos é de que esses microrganismos sejam capazes de infectar todos os estágios de desenvolvimento, ou seja, ovos, lagartas, pupas e adultos dos insetos (LACEY et al., 2015; BAJA et al., 2020). Nesse sentido, novos estudos de prospecção podem fornecer isolados de fungos com um espectro de atividade mais amplo e eficazes ao longo de todo o ciclo biológico de *D. fovealis*.

Nesse contexto, objetivou-se avaliar o potencial de nove isolados de *B. bassiana* obtidos da Coleção Microbiológica da Rede Paranaense (CMRP) - TAXonline em lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*. Os isolados mais virulentos foram selecionados para testes de determinação da concentração letal média, tempo letal médio e tempo de sobrevivência média. Em seguida, foi avaliado o potencial de controle dos isolados mais eficazes em todos os estágios de desenvolvimento de *D. fovealis*. Entender a virulência de microrganismos entomopatogênicos em cada estágio de vida do inseto pode fornecer informações que ajudem a aprimorar as estratégias de biocontrole dentro do programa de manejo integrado para o controle de *D. fovealis*.

2. Material e Métodos

2.1 Criação de *D. fovealis*

Os ovos, lagartas e pupas de *D. fovealis* foram obtidos a partir da criação estoque do laboratório de entomologia Professor Ângelo Moreira da Costa Lima da Universidade Federal do Paraná, estabelecido a partir de insetos silvestres coletados na região metropolitana de Curitiba (PR) e criados a 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa (UR) e 14 h de fotofase (ZAWADNEAK et al., 2017).

Os adultos foram mantidos em gaiolas plásticas (15 cm x 15 cm x 12,5 cm) alimentados com cerveja e solução nutritiva a base de levedo de cereveja e mel (ZAWADNEAK et al., 2017). As paredes das gaiolas foram revestidas com papel toalha para oviposição e trocadas diariamente. Tiras de papel toalha contendo ovos foram cortadas e transferidos para recipientes plásticos (7 cm x

4 cm × 4,5 cm) contendo dieta artificial para alimentação das lagartas durante o seu desenvolvimento (ZAWADNEAK et al., 2017). As pupas foram transferidas para placas de Petri estéreis (15 cm × 2 cm) com papel filtro e algodão úmido até emergência dos adultos.

2.2 Isolados de *B. bassiana*

Os nove isolados entomopatogênicos de *B. bassiana* (TABELA 1) foram obtidos da Coleção Microbiológica da Rede Paranaense (CMRP) – TAXonline, Curitiba, Brasil. Os fungos foram isolados de insetos adultos extrusados pertencentes a espécie *Lema bilineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) coletados em campo não comercial de *Physalis peruviana* da cidade de Campo Largo, PR (25°27'09.8" S 49°34'06.4" O) (FURUIE et al., 2022).

TABELA 1 – LINHAGENS DE *Beauveria bassiana* ISOLADAS DE *Lema bilineata* E SEU NÚMERO DE ACESSO NO GENBANK.

Isolado	GENBANK
CMRP 4480	MZ567038
CMRP 4481	MZ567039
CMRP 4482	MZ567040
CMRP 4483	MZ567041
CMRP 4484	MZ567042
CMRP 4485	MZ567043
CMRP 4486	MZ567044
CMRP 4487	MZ567045
CMRP 4488	MZ567046

FONTE: O autor (2022).

2.3 Preparo do inóculo

Os isolados foram multiplicados em placas de Petri com Ágar Semente de Níger (semente de níger 100 g/L, dextrose 1 g/L, ágar bacteriológico 18 g/L) e incubados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 14 dias e 12 h de fotofase para produção dos conídios (ITO; PIMENTEL; POITEVIN, 2019).

Após esse período, a superfície de crescimento de cada isolado foi raspada utilizando uma espátula de aço estéril e os conídios foram transferidos para tubos falcon com 20 mL de solução salina NaCl 0,85% e Tween 80 0,01%.

As suspensões de conídios de cada isolado foram agitadas em vórtex (772, Fisatom) por 1 minuto e, em seguida, filtrados usando gaze estéril (10 x 15 cm) em novos tubos falcon de 50 mL.

As concentrações foram estimadas com o auxílio da câmara de Neubauer e as suspensões de esporos foram usadas imediatamente após a preparação.

2.4 Viabilidade celular

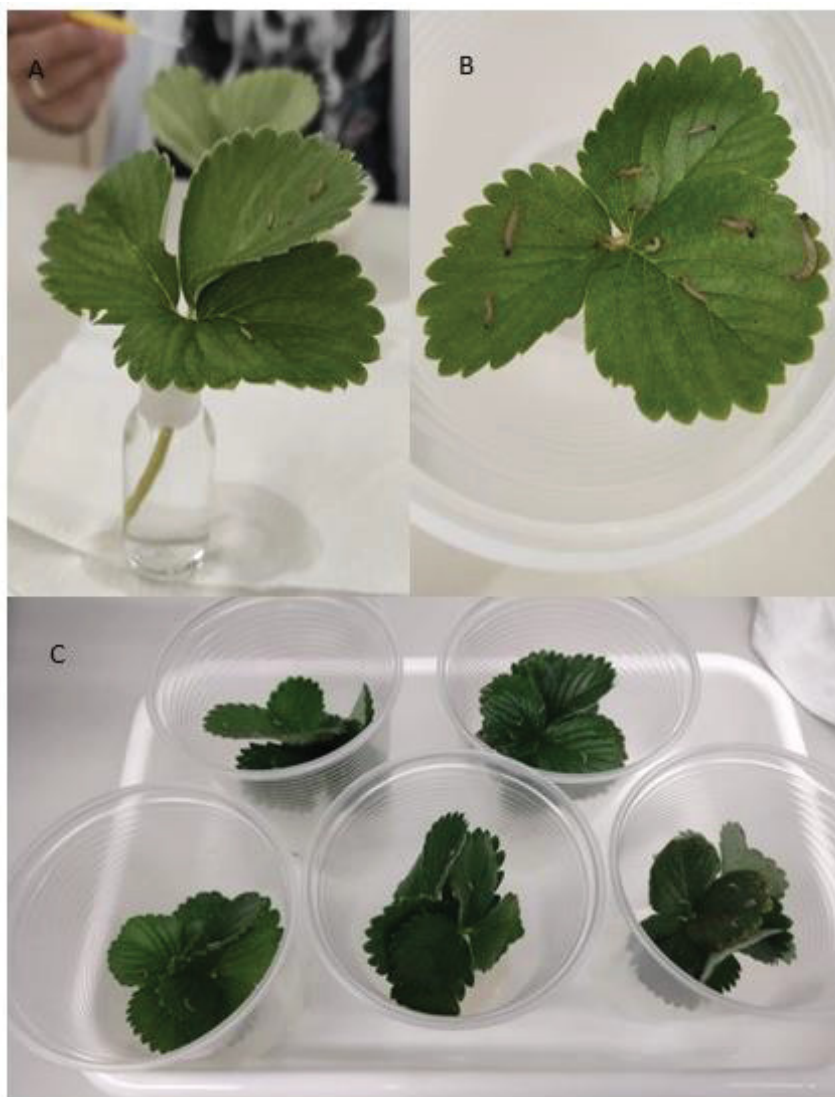
Para avaliar a viabilidade dos isolados fúngicos antes de cada bioensaio foi realizado o teste de germinação. Os conídios foram ajustados na concentração 10^6 conídios/mL (ROJAS, 2015). Posteriormente, foi inoculado 100 μ L de cada isolado em placas de Petri contendo o meio Ágar Batata Dextrose (BDA – Sigma®) e espalhado com auxílio da alça de Drigalski.

As placas foram mantidas em condições controladas (28 ± 1 °C e 14 h de fotofase) por 18 h e a porcentagem de germinação foi avaliada em microscópio óptico (400 \times) contando 200 esporos, sendo considerados viáveis quando o tubo germinativo foi maior que o seu diâmetro (OLIVEIRA et al., 2015).

2.5 Bioensaio de patogenicidade

Os bioensaios foram realizados contra lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis* (POITEVIN et al., 2018). Em recipiente plástico de 500 mL com tampa perfurada foi colocada uma folha de morango desinfestada (ARAÚJO et al., 2002) com o pecíolo embrulhado em algodão e mergulhado em 15 mL de água para manter a hidratação dos folíolos (FIGURA 1).

FIGURA 1 – MONTAGEM DO EXPERIMENTO DE PATOGENICIDADE CONTRA *Duponchelia fovealis*. FOLHA DE MORANGO COM O PECÍOLO EMBRULHADO EM ALGODÃO E Mergulhado em 15 mL DE ÁGUA (A), UMA RÉPLICA COM 10 LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR (B) E UMA REPETIÇÃO NO TEMPO COM CINCO RÉPLICAS (C).



FONTE: O autor (2022).

Grupos de 10 lagartas foram adicionadas com auxílio de um pincel ponta fina em cada folha (FIGURA 1), as quais foram pulverizadas com pulverizador manual com 1 mL de suspensão de conídios na concentração de 10^9 conídios/mL. Como controle negativo foi utilizado solução salina NaCl 0,85% e Tween 80 0,01%.

Após a pulverização, os recipientes foram mantidos em condições controladas (25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de UR e 14 h de fotofase) e a mortalidade foi avaliada após 7 dias. Foram consideradas mortas as lagartas que não

responderam ao estímulo proporcionado pelo toque de um pincel de cerdas finas.

Os insetos mortos foram transferidos para placas de Petri (15 cm × 2 cm) com papel filtro umedecido com água destilada autoclavada para extrusão do fungo e confirmação do agente causal.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada tratamento constou de cinco repetições com 10 insetos cada (FIGURA 1), e todo o experimento foi realizado duas vezes, totalizando 100 lagartas para cada fungo no final do experimento.

2.6 Bioensaio de estimativa da concentração letal média, tempo letal médio e tempo médio de sobrevivência de *D. fovealis*

Os isolados de fungos que causaram taxas de mortalidade superior a 80% das lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis* foram selecionados para cálculo de concentração letal média (CL₅₀) e tempo letal médio (TL₅₀), pois esse critério de eficiência é exigido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para registro de produtos como inseticidas (BACCI et al., 2007; SILVA et al., 2011; FILOMENO et al., 2017).

Para estimativa da CL₅₀, seis concentrações foram testadas: 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9 conídios/mL. Como controle negativo foi utilizado solução salina NaCl 0,85% e Tween 80 0,01%. As lagartas foram tratadas conforme metodologia descrita no item 2.5.

Para determinar o TL₅₀ e tempo médio de sobrevivência (TMS) de *D. fovealis*, foi utilizado a CL₅₀. O procedimento para a realização do bioensaio foi o mesmo descrito anteriormente e a avaliação foi feita diariamente ao longo de 7 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada tratamento constou de cinco repetições com 10 insetos cada, e todo o experimento foi realizado duas vezes, totalizando 100 lagartas para cada fungo no final do experimento.

2.7 Avaliação de virulência em diferentes estágios imaturos de desenvolvimento de *D. fovealis*

2.7.1 Efeito dos isolados fúngicos na viabilidade dos ovos de *D. fovealis*

Com auxílio de um microscópio estereoscópico, ovos de 24 h de *D. fovealis* foram contados a partir das tiras de papel toalha usadas como suporte para oviposição de fêmeas adultas (ZAWADNEAK et al., 2017).

Uma tira contendo 20 ovos foi recortada e considerado uma réplica para o bioensaio. As tiras de papel com ovos foram imersas por 10 segundos em suspensão de conídios na concentração da CL₅₀ (AYDIN et al., 2018).

Após a imersão, as tiras com os ovos inoculados foram depositadas em uma folha de papel toalha autoclavada para remoção do excesso de umidade. As tiras de papel com ovos foram então colocadas em tubos de vidro lacrados com algodão e armazenados em condições controladas (25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de UR e 14 h de fotofase). A viabilidade embrionária foi monitorada diariamente ao longo de sete dias utilizando um microscópio estereoscópico. Como controle negativo foi utilizada solução salina NaCl 0,85% e Tween 80 0,01% (BAJA et al., 2020).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada tratamento constou de cinco repetições com 20 ovos cada, e todo o experimento foi realizado duas vezes, totalizando 200 ovos para cada fungo no final do experimento.

2.7.2 Efeito dos isolados fúngicos em lagartas de *D. fovealis*

As lagartas de 1º a 5º ínstar de *D. fovealis* foram pulverizadas com a concentração da CL₅₀ calculada dos isolados. As lagartas foram pulverizadas conforme metodologia descrita no item 2.5, as amostras foram mantidas em condições controladas (25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de UR e 14 h de fotofase) e a mortalidade foi avaliada após 7 dias. Como controle negativo foi utilizado solução salina NaCl 0,85% e Tween 80 0,01%.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada tratamento constou de cinco repetições com 10 insetos cada, e todo o

experimento foi realizado duas vezes, totalizando 100 lagartas para cada fungo e ínstar no final do experimento.

2.7.3 Efeito dos isolados fúngicos na viabilidade das pupas de *D. fovealis*

Grupos de 8 pupas de *D. fovealis* de 24 h de idade foram desinfestadas com solução de hipoclorito a 0,2% e água destilada autoclavada (PARRA, 2007). Em seguida, foi pulverizado com auxílio de pulverizador manual, 1 mL da CL₅₀ calculada para os isolados fúngicos. As pupas foram colocadas em placa de Petri (15 cm x 2 cm) com papel filtro estéril para remoção do excesso de umidade.

Após a pulverização, as pupas foram mantidas em condições controladas (25 ± 2 °C, 70 ± 10% de UR e 14 h de fotofase) e a emergência foi avaliada após 7 dias. Como controle negativo foi utilizado solução salina NaCl 0,85% e Tween 80 0,01% (BAJA et al., 2020). As pupas que não emergiram foram colocadas em placas de Petri com algodão estéril umedecido e forradas com papel filtro para avaliação da extrusão fúngica e confirmação do agente causal.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada tratamento constou de cinco repetições com 8 pupas cada, e todo o experimento foi realizado duas vezes, totalizando 80 pupas para cada fungo no final do experimento.

2.8 Análise estatística

A viabilidade embrionária, mortalidade de larvas e pupas foram corrigidas usando a fórmula de Abbott (ABBOTT, 1925):

$$Ma = \frac{(Mt - Mc)}{(100 - Mc)} \times 100$$

onde:

Ma = mortalidade corrigida em função do tratamento testemunha;

Mt = mortalidade observada no tratamento com fungos;

Mc = mortalidade observada no tratamento testemunha.

A normalidade dos dados obtidos foi avaliada com o teste de Shapiro-Wilk e, posteriormente, foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e Kruskal-

Wallis. As médias foram comparadas pelo teste Tukey e Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DSCF). Os resultados foram analisados com o *software* R (R CORE TEAM, 2021).

Os dados de concentração letal e de tempo letal foram submetidos à análise de Probit através do *software* PoloPlus (ROBERTSON et al., 2008). As curvas de sobrevivência foram estimadas pelo teste de Kaplan-Meier (KAPLAN; MEIER, 1958) e comparadas pelo teste log-rank, usando o *software* Sigma plot.

3. Resultados

3.1 Bioensaio de patogenicidade

A taxa de germinação dos isolados fúngicos (TABELA 2) variou de 94,98% para o isolado 4485 a 98,68% para o isolado 4482 (FIGURA 2). A mortalidade das lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis* variou de 27,30% para o isolado 4484 a 86% para o isolado 4485 (FIGURA 3) ($F_{2,61} = 34$; $p < 0,01$).

TABELA 2 – GERMINAÇÃO (%) DOS ISOLADOS DE *Beauveria bassiana* EM MEIO BDA NA CONCENTRAÇÃO 1×10^6 CONÍDIOS/mL APÓS 18 HORAS DE INCUBAÇÃO A 28 ± 1 °C E 14 HORAS DE FOTOFASE.

Isolado	Germinação (%)
CMRP 4480	97,13 \pm 0,01
CMRP 4481	97,46 \pm 0,48
CMRP 4482	98,68 \pm 2,52
CMRP 4483	97,20 \pm 0,72
CMRP 4484	97,12 \pm 0,96
CMRP 4485	94,98 \pm 1,54
CMRP 4486	97,48 \pm 0,77
CMRP 4487	97,23 \pm 0,83
CMRP 4488	96,81 \pm 1,39

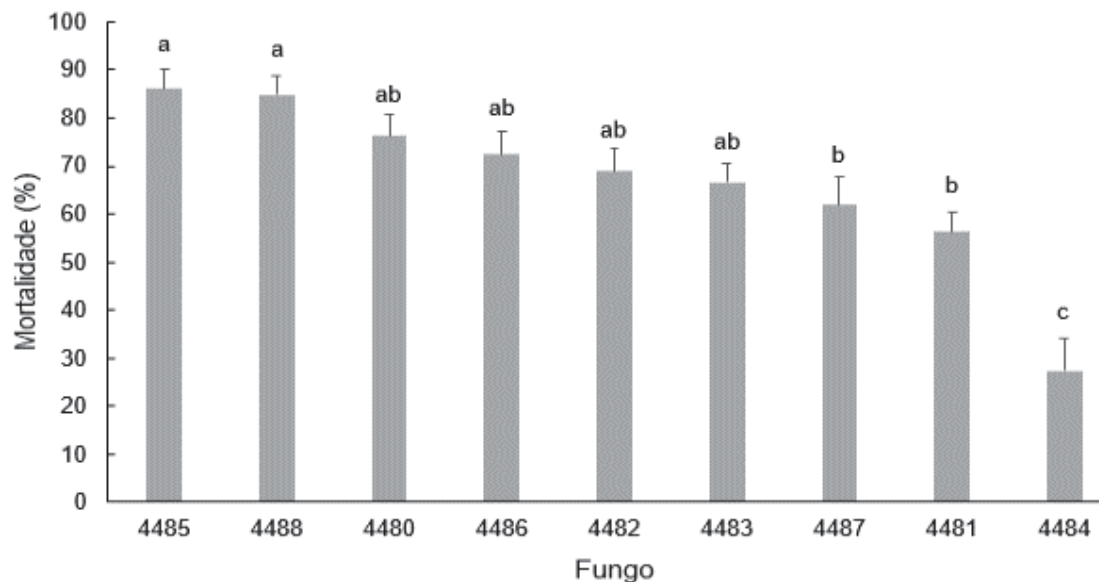
FONTE: O autor (2022).

FIGURA 2 – TESTE DE GERMINAÇÃO EM MEIO BDA APÓS 18 HORAS DE INCUBAÇÃO. VISUALIZAÇÃO EM MICROSCÓPIO ÓPTICO (400×) DO CONÍDIO GERMINADO (A) E CONÍDIO NÃO GERMINADO (B).



FONTE: O autor (2022).

FIGURA 3 – MORTALIDADE (% MÉDIA ± ERRO PADRÃO) DE LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE *Duponchelia fovealis* PULVERIZADAS COM SUSPENSÃO FÚNGICA NA CONCENTRAÇÃO DE 10^9 CONÍDIOS/mL, APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ± 2 °C, 70 ± 10% DE UR e 14 HORAS DE FOTOFASE.



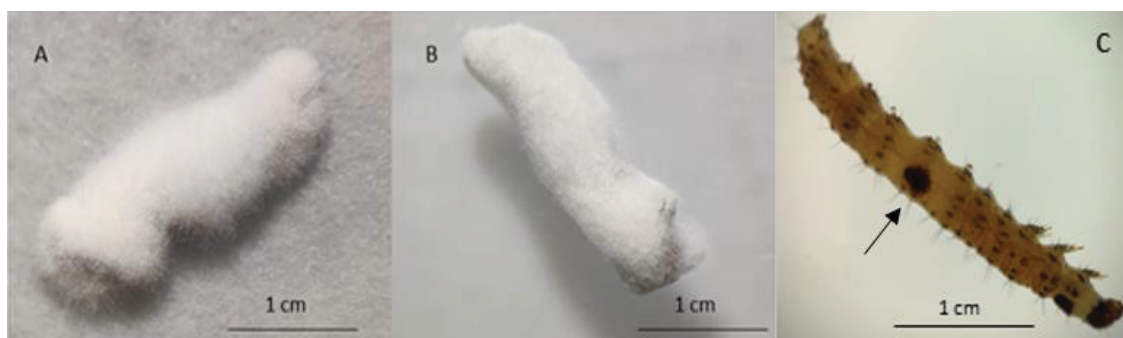
FONTE: O autor (2022).

NOTA: Barras com a mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste Tukey ($p < 0,01$).

As maiores taxas de mortalidade foram obtidas com os isolados 4485 (86,11%) e 4488 (83,33%) (FIGURA 3), e por isso estes isolados foram

selecionados para os testes posteriores. O isolado 4484 apresentou a menor patogenicidade, com taxa de mortalidade de 29,17%. Todas as lagartas mortas que apresentaram extrusão fúngica continham melanização cuticular indicando a infecção (FIGURA 4).

FIGURA 4 – EXTRUSÃO DO FUNGO *Beauveria bassiana* EM LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE *Duponchelia fovealis* AVALIADA EM ESTEREOMICROSCÓPIO ÓPTICO APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ± 2 °C, $60 \pm 10\%$ DE UR E 12 HORAS DE FOTOFASE. ISOLADO 4485 (A), ISOLADO 4488 (B) E LAGARTA COM MELANIZAÇÃO CUTICULAR (C). AUMENTO DE 20 \times .



FONTE: O autor (2022).

3.2 Bioensaio de estimativa da concentração letal média, tempo letal médio e tempo médio de sobrevivência de *D. fovealis*

A análise Probit mostrou diferenças na virulência entre os tratamentos com os isolados 4485 e 4488. O mais virulento foi o isolado 4488, com a menor CL_{50} , $3,3 \times 10^6$ conídios/mL (TABELA 3).

A TL_{50} foi diferente entre os tratamentos, sendo 145,20 h para o isolado 4485 e 143,52 h para o isolado 4488. A sobreposição foi observada dentro do intervalo de confiança de 95% e, portanto, não são estatisticamente diferentes (TABELA 3).

TABELA 3 – ANÁLISE DE PROBIT PARA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA, TEMPO LETAL MÉDIO E TESTE LOG-RANK PARA ESTIMATIVA DO TEMPO MÉDIO DE SOBREVIVÊNCIA DOS ISOLADOS DE *Beauveria bassiana* 4485 e 4488 CONTRA LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE *Duponchelia fovealis*.

Tratamento	4485	4488
N	650	600
CL ₅₀ ^a (IC 95% ^d)	1,7 x 10 ⁷ (9,9 x 10 ⁶ – 3,3 x 10 ⁷) a	3,3 x 10 ⁶ (1,7 x 10 ⁶ – 6,1 x 10 ⁶) b
Coeficiente angular (±EP ^e)	0,45 ± 0,03	0,47 ± 0,04
X ² (gl = 4 ^f)	2,53	2,10
TL ₅₀ ^b (IC 95% ^d)	145,2 (132,48 – 163,44) a	143,52 (132 – 160,56) a
Coeficiente angular (±EP ^e)	0,35 ± 0,03	5,66 ± 0,59
X ² (gl = 5 ^f)	6,45	6,27
TMS ^c (IC 95% ^d)	106,56 (97,57 – 116,54) a	121,53 (114,61 – 128,45) a
X ² (gl = 1 ^f)	2,52	2,52

^a CL: Concentração letal (conídios/mL);

^b TL: Tempo letal (horas);

^c TMS: Tempo Médio de Sobrevivência (horas);

^d Intervalo de confiança;

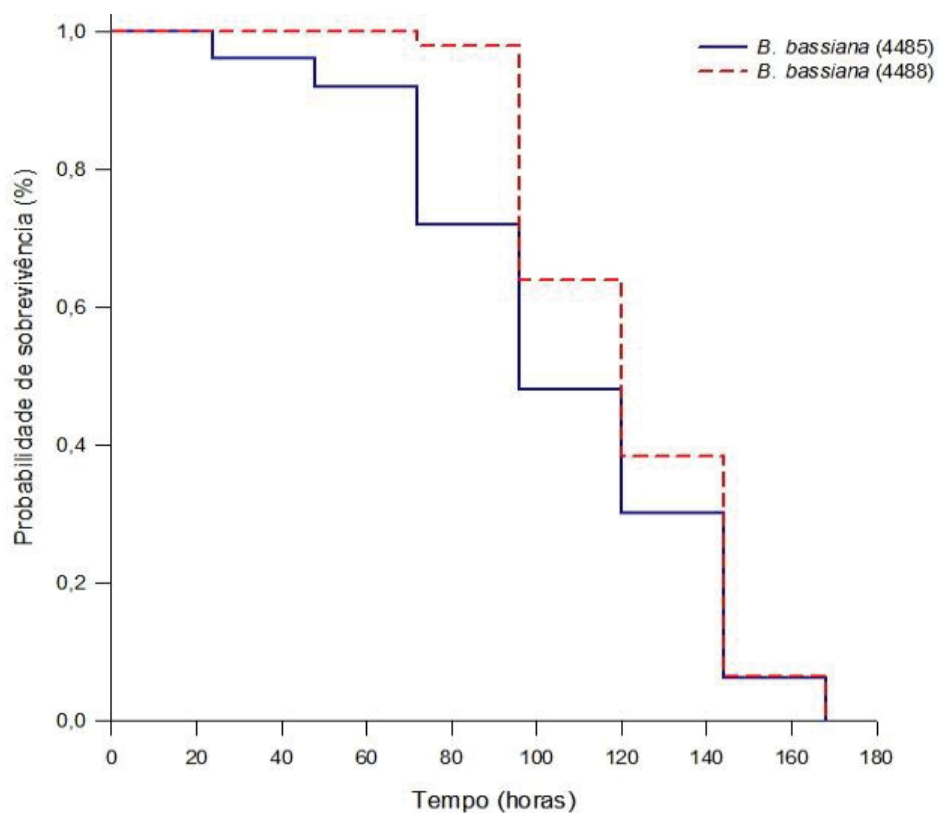
^e Erro Padrão;

^f Grau de liberdade.

FONTE: O autor (2022).

O tempo médio de sobrevivência foi de 106,56 h para as lagartas tratadas com o isolado 4485 e de 121,53 h para as lagartas tratadas com o isolado 4488 (TABELA 3). Apesar do isolado 4488 ter apresentado menor valor de CL₅₀, o isolado 4485 diminuiu mais rápido a chance de sobrevivência de *D. fovealis* ao longo do tempo (FIGURA 5).

FIGURA 5 – CURVA DE SOBREVIVÊNCIA (HORAS) DE LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE *Duponchelia fovealis* COM OS ISOLADOS 4485 NA CONCENTRAÇÃO DE $1,7 \times 10^7$ CONÍDIOS/mL E 4488 NA CONCENTRAÇÃO DE $3,3 \times 10^6$ CONÍDIOS/mL DE *Beauveria bassiana* USANDO O TESTE KAPLAN-MEIER.



FONTE: O autor (2022).

3.3 Avaliação de virulência em diferentes estágios imaturos de desenvolvimento de *D. fovealis*

3.3.1 Efeito dos isolados fúngicos na viabilidade dos ovos de *D. fovealis*

A viabilidade dos ovos de *D. fovealis* foi afetada pelos isolados 4485 e 4488 quando submetidos às CL₅₀ de cada isolado fúngico (TABELA 4). Foi observado diferença significativa na taxa de eclosão dos ovos em relação ao grupo controle, não existindo diferença estatística entre os tratamentos ($\chi^2_{9,21} = 10,1$; $p < 0,01$).

TABELA 4 – OVOS NÃO VIÁVEIS (% MÉDIA ± ERRO PADRÃO) DE *Duponchelia fovealis* PULVERIZADOS COM SUSPENSÃO FÚNGICA DOS ISOLADOS 4485 E 4488 APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ DE UR e 14 HORAS DE FOTOFASE.

Isolado	Concentração (conídios/mL)	Taxa de ovos não viáveis (%)
Controle	-	0,00 ± 0,00 b
4485	$1,7 \times 10^7$	8,31 ± 3,09 a
4488	$3,3 \times 10^6$	6,74 ± 2,39 a

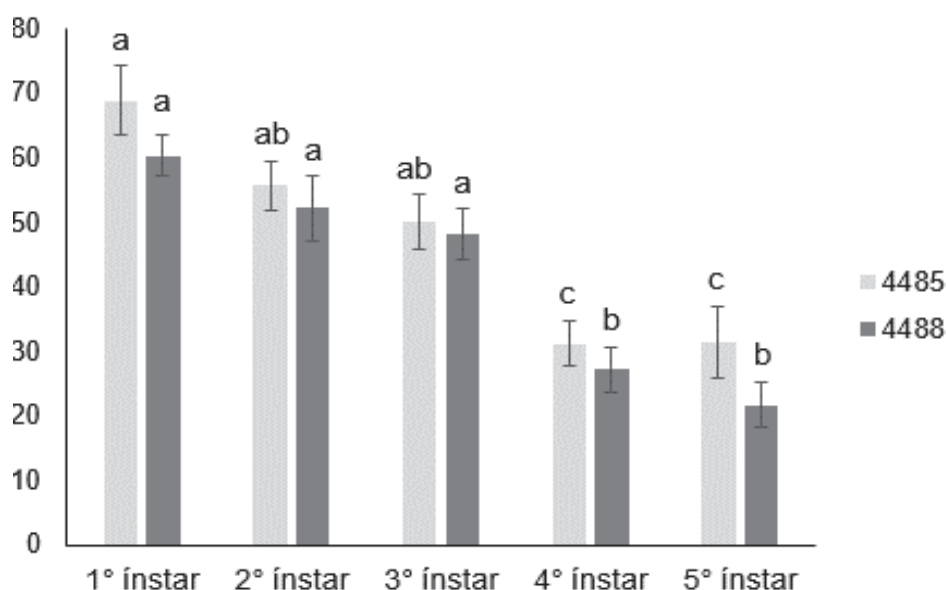
FONTE: O autor (2022).

NOTA: Linhas com a mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de DSCF ($p < 0,01$).

3.3.2 Efeito dos isolados fúngicos em lagartas de *D. fovealis*

A mortalidade das lagartas de *D. fovealis* foi afetada conforme desenvolvimento do ínstar, sendo o 1º, 2º e 3º ínstar com taxas de mortalidade superiores a 50%. As taxas de mortalidade de lagartas de 4º e 5º ínstar diminuíram para 31,71% e 29,33% para o isolado 4485 e 29,11% e 22,78% para o isolado 4488, respectivamente, sendo, portanto, os menos afetados ($F_{1,8} = 12,8$; $p < 0,01$) para o isolado 4485 e ($F_{1,8} = 18,3$; $p < 0,01$) para o isolado 4488 (FIGURA 6).

FIGURA 6 – MORTALIDADE (% MÉDIA ± ERRO PADRÃO) DE LAGARTAS DE *Duponchelia fovealis* PULVERIZADAS COM SUSPENSÃO FÚNGICA NA CONCENTRAÇÃO DE $1,7 \times 10^7$ CONÍDIOS/mL PARA O ISOLADO 4485 E $3,3 \times 10^6$ CONÍDIOS/mL PARA O ISOLADO 4488, APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ DE UR e 14 HORAS DE FOTOFASE.



FONTE: O autor (2022).

NOTA: Barras com a mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste Tukey para o mesmo isolado fúngico ($p < 0,01$).

3.3.3 Efeito dos isolados fúngicos na viabilidade das pupas de *D. fovealis*

Os dois isolados fúngicos, 4485 e 4488, causaram um efeito significativo ($\chi^2_{9,21} = 20,7$; $p < 0,01$) na viabilidade de pupas de *D. fovealis* (TABELA 5) em relação ao controle, mas não houve diferença entre os tratamentos. Todas as pupas não viáveis apresentaram extrusão fúngica (FIGURA 7). Ambos os isolados inviabilizaram aproximadamente 30% das pupas.

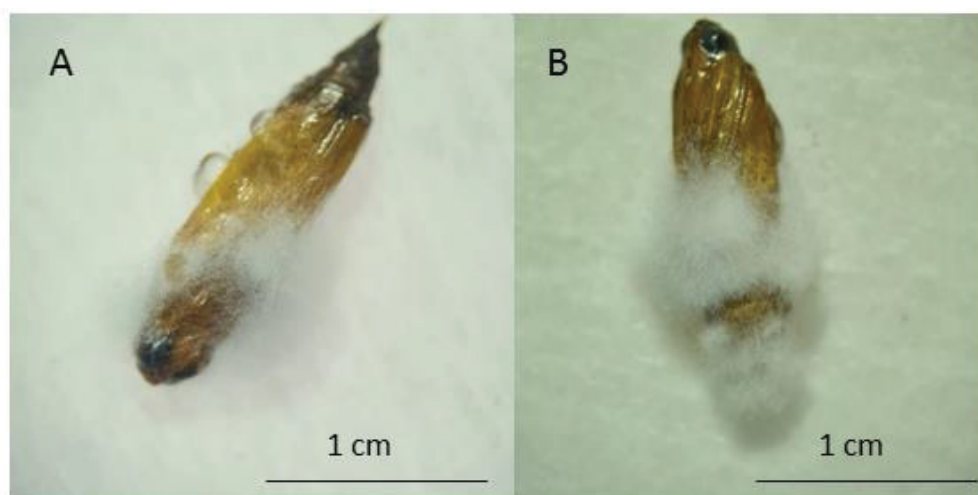
TABELA 5 – PUPAS NÃO VIÁVEIS (% MÉDIA \pm ERRO PADRÃO) DE *Duponchelia fovealis* PULVERIZADAS COM SUSPENSÃO FÚNGICA DOS ISOLADOS 4485 E 4488 APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ DE UR e 14 HORAS DE FOTOFASE.

Isolado	Concentração (conídios/mL)	Pupas não viáveis (%)
Controle	-	0,00 (\pm 0,00) b
4485	$1,7 \times 10^7$	32,0 (\pm 3,69) a
4488	$3,3 \times 10^6$	33,3 (\pm 5,62) a

FONTE: O autor (2022).

NOTA: Linhas com a mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de DSCF ($p < 0,01$).

FIGURA 7– EXTRUSÃO DO FUNGO *Beauveria bassiana* EM PUPAS DE *Duponchelia fovealis* AVALIADA EM ESTEREOMICROSCÓPIO ÓPTICO APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ± 2 °C, $60 \pm 10\%$ DE UR E 12 HORAS DE FOTOFASE (20 \times). ISOLADO 4485 (A) E ISOLADO 4488 (B).



FONTE: O autor (2022).

4. Discussão

A avaliação da patogenicidade sobre lagartas de terceiro instar de *D. fovealis* nesse estudo demonstrou que dois isolados de *B. bassiana* (4485 e

4488) se mostraram altamente patogênicos, com taxas de mortalidade de 86,11% e 83,33%, respectivamente, na concentração de 10^9 conídios/mL. Novos estudos de prospecção que avaliam a patogenicidade de fungos entomopatogênicos são importantes para auxiliar na seleção de isolados com potencial para controlar populações de pragas agrícolas. Os isolados fúngicos avaliados nesse estudo foram previamente isolados e testados contra o coleóptero *L. bilineata* (FURUIE et al., 2022). O isolado 4488 apresentou os melhores resultados entre os isolados estudados, com mortalidade de 80% para os indivíduos adultos. Nesse estudo, o isolado 4484 também apresentou a menor taxa de mortalidade. Este é o primeiro relato de linhagens de *B. bassiana* isoladas de coleópteros com atividade entomopatogênica contra *D. fovealis*.

Resultados semelhante à nossa pesquisa foram observados em estudos utilizando fungos isolados do solo (AMATUZZI et al., 2018a), folhas (AMATUZZI et al., 2018b) e insetos (POITEVIN et al., 2018) contra lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*. Amatuzzi et al. (2018a) evidenciaram fungos entomopatogênicos, em especial *B. bassiana*, com potencial para o controle da lagarta da coroa, com mortalidades superiores a 80% na concentração de 10^9 conídios/mL em condições de laboratório e acima de 50% em casa de vegetação na concentração de 10^6 conídios/mL, indicando seu potencial como alternativa de manejo eficaz contra esta praga agrícola.

A patogenicidade de fungos entomopatogênicos na concentração de 10^9 conídios/mL também foi baixa contra lagartas de terceiro ínstar de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (THOMAZONI et al., 2014). O mesmo foi observado por Amatuzzi et al., (2018a, 2018b) ao submeter lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis* a diferentes espécies de entomatógenos na concentração de 10^9 conídios/mL. Desta forma, a realização de bioensaios de seleção de isolados mais eficientes representa uma importante ferramenta para alcançar o sucesso do controle de uma determinada praga. Sendo assim, a variabilidade observada nas taxas de mortalidade entre as linhagens fúngicas testadas pela primeira vez em um grupo de insetos já é esperada (AMATUZZI et al., 2018a). Além disso, a variação de mortalidade entre os isolados de *B. bassiana* encontrado nesse estudo pode estar relacionado à seletividade de certas linhagens para hospedeiros específicos como alvos. A patogenicidade dos fungos entomopatogênicos é variável entre as espécies, os isolados dentro da

mesma espécie, as espécies de insetos e as fases de desenvolvimento do inseto no qual o fungo é aplicado (RODRIGUES, 2019).

O tegumento dos insetos é constituído de nanofibras de quitina cristalina associado a uma matriz de proteínas, polifenóis, água e lipídios, que podem variar entre as espécies e podem ser degradados por proteases, quitinases e lipases que trabalham em conjunto a fim de facilitar o processo de penetração da cutícula por fungos entomopatogênicos (ISLAM et al., 2021). A formação dos apressórios pelo fungo durante a penetração na cutícula está correlacionada com a primeira enzima produzida na cutícula, que são as endoproteases e aminopeptidase. Essas enzimas são fundamentais no processo de infecção, visto que mais de 70% da cutícula do inseto é composta por proteínas (CHARNLEY, 2003; ISLAM et al., 2021). Uma vez que a cutícula tenha sido penetrada, os fungos têm como objetivo chegar ao sistema respiratório do inseto, além de obter a nutrição máxima através da produção de blastósporos e hifas vegetativas. Como resultado, ocorre produção de micotoxinas, invasão de tecidos e falta de nutrientes resultando na morte do inseto (ISLAM et al., 2021).

Desta forma, a cutícula dos insetos é uma barreira físico-química altamente eficiente contra a penetração de muitos agentes entomopatogênicos (VINCENT; WEGST, 2004). A patogenicidade e a virulência variante entre as espécies de fungos ou linhagem na mesma espécie sobre o inseto alvo podem ser influenciadas pela variação da atividade enzimática existente dos isolados, como lipases, quitinases e proteases, que é fundamental no processo de infecção para a penetração na cutícula do inseto e que é expressa a partir da germinação dos conídios (BOUCIAS et al., 2000) ou nas diferenças fenotípicas entre as populações de um inseto (MONNERAT et al., 2006). Tais fatores podem explicar a baixa seletividade de alguns isolados de *B. bassiana* deste estudo para as lagartas de *D. fovealis*.

O isolado 4488 apresentou a menor CL₅₀ quando comparado ao isolado 4485, $3,3 \times 10^6$ e $1,7 \times 10^7$ conídios/mL, respectivamente. Um menor valor de CL₅₀ indica maior virulência de um isolado fúngico. Desta forma, um isolado menos virulento precisa de uma concentração maior de conídios para causar a mesma mortalidade de lagartas de *D. fovealis* que um isolado mais virulento (RONDELLI et al., 2012).

Em geral, os valores da CL_{50} dos isolados 4485 e 4488 obtidos neste estudo foram baixos e semelhantes ao encontrado por Amatuzzi et al. (2018a) e Poitevin et al. (2018) para isolados de *B. bassiana* com valores de CL_{50} variando entre $1,7 \times 10^4$ e $5,3 \times 10^6$ conídios/mL contra lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*. Esses resultados demonstram o grande potencial deste gênero no controle das lagartas de *D. fovealis*. Sendo assim, o uso de isolados de *B. bassiana* para o controle de *D. fovealis* é um método econômico por não requerer a pulverização de uma concentração elevada de suspensão de conídios.

A mortalidade das lagartas pulverizadas com os valores da CL_{50} estimadas para cada fungo aumentou ao longo do tempo. Em média, 144 horas é o tempo necessário para que os isolados fúngicos matem 50% das lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*. A menor sobrevivência média das lagartas foi observada para o isolado 4488 que apresentou TL_{50} de 143,52 h e não diferiu de acordo com o IC a 95% do isolado 4485 com TL_{50} de 145,2 h. O tempo letal médio estimado no presente estudo para os isolados 4485 e 4488 foi menor que o encontrado por Amatuzzi et al. (2018a) para o *Beauveria* Bea 111 (172,8 h) e maior que o encontrado por Poitevin et al. (2018) para o isolado B2 (93,6 h) em lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*.

Apesar do 4485 ter apresentado menor virulência, a sua curva de sobrevivência diminuiu mais rápido a chance de sobrevivência de *D. fovealis* ao longo do tempo com um TMS de 106,56 h, enquanto o isolado 4488 apresentou TMS de 121,53 h. Porém, foi observado sobreposição dentro do intervalo de confiança a 95%, o que indica que não há diferença estatística significativa. Estimar o tempo de exposição e a chance de sobrevivência de uma determinada praga são parâmetros importantes para avaliar a patogenicidade de um microrganismo entomopatogênico (RONDELLI et al., 2012; ROBLES-ACOSTA et al., 2019). No campo, a morte precoce do inseto é desejável e a incapacidade de matar rapidamente é uma desvantagem para o uso de entomatógenos, visto que a sobrevivência de insetos infectados por longos períodos pode continuar causando danos a planta (RONDELLI et al., 2012; MOHAMMADBEIGI; PORT, 2015).

Neste trabalho, a concentração da CL_{50} estimada com as lagartas de terceiro ínstar afetaram a viabilidade dos ovos em 8,31% para o isolado 4485 e 6,74% para o isolado 4488 de *B. bassiana*. O isolado 4488 também afetou a

viabilidade de ovos de *L. bilineata* em 58% (FURUIE et al., 2022). A atividade ovicida de fungos entomopatogênicos como *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi previamente relatada em outros insetos lepidópteros. Akutse et al. (2019) observaram alta susceptibilidade dos ovos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) à infecção por isolados de *M. anisopliae* (>70%) e isolados de *B. bassiana* (>51%) na concentração de 10^8 conídios/mL. Da mesma forma, El Shafei et al. (2022) observaram redução na capacidade de eclosão dos ovos de *Ephestia cautela* (Lepidoptera: Pyralidae) em mais de 20% para *B. bassiana*, sendo *M. anisopliae* mais eficaz com redução em mais de 35% na eclosão dos ovos na menor concentração testada (10^5 conídios/mL).

Resultados diferentes foram observadas por Baja et al., (2020), onde a viabilidade dos ovos de *D. fovealis*, não diferiram significativamente do controle mesmo quando inoculados nas maiores concentrações (10^9 conídios/mL) de dois isolados entomopatogênicos de *B. bassiana* e *Cordyceps javanica*. Os fungos entomopatogênicos possuem a capacidade de infectar todos os estágios de vida de insetos pragas, porém os ciclos de vida não são igualmente suscetíveis à infecção (OPISA et al., 2018). Os ovos de insetos funcionam como barreira a fatores abióticos e são estruturados para proteger o embrião em desenvolvimento, por conta disso, este estágio pode ser o mais difícil de infectar (ZHANG; SHI; FENG, 2014; CAMPBELL; PEREIRA; KOEHLER, 2016).

As cascas dos ovos de artrópodes são compostas principalmente de proteínas cristalinas com poucas aberturas aerópilas para respiração. Estudos mostram que os tubos germinativos de *B. bassiana* podem se alongar na superfície do ovo para encontrar locais apropriados para penetração. Porém, além da penetração normal, outros isolados fúngicos, como *I. fumosorosea*, apresentam atividades enzimáticas envolvidas na degradação das proteínas cristalinas da casca do ovo, o que confere uma maior chance no processo de penetração para explorar a nutrição de ovos (ZHANG; SHI; FENG, 2014). Entretanto, estudar o efeito de fungos entomopatogênicos na viabilidade dos ovos de pragas agrícolas é crucial para otimizar o controle populacional dentro da cultura afetada.

Os isolados 4485 e 4488 de *B. bassiana* foram eficientes em diminuir a viabilidade de pupas de *D. fovealis* em 32% para o isolado 4485 e 33,3% para o isolado 4488 neste estudo quando comparado ao grupo controle. Pesquisas

anteriores também relataram a eficiência dessa espécie de fungo no controle de pupas para outros lepidópteros, como como *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae) (SCHEMMER et al., 2016). Porém, Baja et al. (2020) ao testar o entomopatógeno *B. bassiana*, observou que este fungo apresentou menor desempenho no controle de pupas de *D. fovealis* em relação a isolados fúngicos de outras espécies. O mesmo resultado foi observado por Schemmer et al. (2016) que verificou uma maior virulência de isolados de *Isaria fumosorosea* para pupas de *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae). Além disso, neste estudo todas as pupas não viáveis apresentaram extrusão fúngica após 5 dias de incubação confirmando a morte pelo agente causal, diferente de outros autores que não observaram a confirmação da mortalidade induzida por fungos (BAJA et al., 2020; GARRIDO-JURADO et al., 2020).

Os isolados de *B. bassiana* na CL₅₀ causaram maior mortalidade nos primeiros estágios de desenvolvimento larval sendo observado a diminuição na mortalidade de lagartas de *D. fovealis* à medida que acontece o desenvolvimento do sistema imunológico do inseto, o quarto e quinto ínstar foram os estágios larvais menos afetados. A alta taxa de mortalidade apresentada nos primeiros estágios de desenvolvimento está relacionada com a fragilidade do sistema imunológico das lagartas ao entomopatógeno (INGLIS et al., 2012). Baja et al. (2020) também constataram que lagartas de primeiro ínstar de *D. fovealis* apresentam maior suscetibilidade a *B. bassiana* (Bea 111). Em contrapartida, também foi observado maior susceptibilidade nas lagartas de quinto ínstar de *D. fovealis* e menor taxa de mortalidade nas lagartas de segundo e quarto ínstar. Contudo, a resposta imune dos insetos é mais eficaz em ínstars larvais mais avançados que apresentam seu sistema de defesa melhor estabelecido, bem como a presença de um tegumento resistente (SRYGLEY, 2012).

A resistência a doenças nos invertebrados baseia-se no sistema inato de defesa. O sistema imunológico dos lepidópteros caracteriza-se em reações humorais e celulares coordenadas. A reação humoral é responsável pelo processo de coagulação da hemolinfa e melanização. Enquanto que a resposta celular se refere a atividade de hemócitos que são as células de defesa suspensas na hemolinfa com a função de fagocitose, encapsulamento e formação de nódulos (JIANG; VILCINSKAS; KANOST, 2010; STUART et al., 2022). No presente estudo, foi observado a melanização cuticular, ou seja, a

formação do pigmento melanina por polimerização de compostos fenólicos, em todas as lagartas infectadas, indicando que o sistema imunológico de *D. fovealis* reagiu à infecção.

A virulência de entomopatógenos a lagartas de *D. fovealis* dependem do isolado e a concentração utilizada, bem como o ínstar de *D. fovealis* (BAJA et al., 2020). Além do mais, uma vez que a extrusão ocorre, novos conídios podem ser liberados para causar infecções em novas lagartas (XIONG et al., 2013). Os isolados mais patogênicos, 4485 e 4488, foram capazes de esporular a partir dos insetos mortos e estes podem atuar como fonte de inóculo. Estudar a resposta dos diferentes estágios de *D. fovealis* a patógenos é importante para determinar a sensibilidade dessas etapas às estratégias de controle biológico envolvendo fungos.

O fungo entomopatogênico *B. bassiana* é largamente utilizado no controle de pragas agrícolas em condições laboratoriais e de campo (ISLAM et al., 2021). *Beauveria bassiana* é um dos entomopatógenos mais pesquisados por sua capacidade de atuar em uma grande variedade de hospedeiros e por possuir maior exigência nutricional. Dentre seus hospedeiros incluem-se hemípteros, dípteros, himenópteros, ortópteros, coleópteros e lepidópteros (VEGA et al., 2012). Apesar de promissor, ainda não existem bioinseticidas formulados a partir de fungos entomopatogênicos registrados para controle de *D. fovealis* na cultura de morangueiro no Brasil e em outros países (ZAWADNEAK et al., 2016; AGROFIT, 2020).

Deste modo, o presente estudo fornece evidências de duas novas linhagens de *B. bassiana* (4485 e 4488) isoladas a partir de insetos adultos de *L. bilineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) como agentes de controle de ovos, lagartas e pupas de *D. fovealis* em condições de laboratório. Nesse contexto, existem grandes oportunidades para o uso de fungos entomopatogênicos dentro do controle biológico de pragas agrícolas que podem melhorar a estabilidade ambiental e segurança alimentar, bem como servir como uma alternativa dentro do Manejo Integrado de Pragas.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. The Value of the Dry Substitutes for Liquid Lime. **Journal of**

Economic Entomology, v. 18, p. 265–267, 1925.

AGROFIT. **AGROFIT — Português (Brasil)**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>>. Acesso em: 8 set. 2021.

AKUTSE, K. S. et al. Ovicidal effects of entomopathogenic fungal isolates on the invasive Fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 143, n. 6, p. 626–634, 2019.

ALVES, R. T.; FARIA, M. Pequeno Manual Sobre Fungos Entomopatogênicos. **Embrapa Cerrados**, p. 47, 2010.

AMATUZZI, R. F. et al. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to soil-borne entomopathogenic fungi. **Insects**, v. 9, n. 2, 2018a.

AMATUZZI, R. F. et al. Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera:Crambidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 3, p. 429–435, 2018b.

ARAÚJO, W. L. et al. Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. **CALQ**, 2002.

AYDIN, T. et al. Significant mortality of eggs and young larvae of two pine processionary moth species due to the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 4, p. 317–331, 2018.

BACCI, L. et al. Toxicity of insecticides to the sweetpotato whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) and its natural enemies. **Pest Management Science**, v. 63, n. 7, p. 699–706, jul. 2007.

BAJA, F. et al. Infection of *Beauveria bassiana* and *Cordyceps javanica* on different immature stages of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). **Crop Protection**, v. 138, n. June, 2020.

BRAMBILA, J.; STOCKS, I. The European pepper moth, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a Mediterranean pest moth discovered in central Florida. **Pest Alert DACS-P-01752, Florida Dept. of Agric. and Consumer Services, Div. Plant Industry**, n. December 2016, p. 1–4, 2010.

CAMPBELL, B. E.; PEREIRA, R. M.; KOEHLER, P. G. Complications with Controlling Insect Eggs. **Insecticides Resistance**, v. 32, p. 137–144, 2016.

CHARNLEY, A. K. Fungal Pathogens of Insects : Cuticle Degrading Enzymes and Toxins. **Botanical research**, v. 40, 2003.

EL SHAFEI, W. K. M.; MAHMOUD, R. H.; MOHAMED, S. S. Efficacy of some entomopathogens against *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) in stored date fruits. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 32, n. 45, p. 7, 2022.

FILOMENO, C. A. et al. *Corymbia* spp. and *Eucalyptus* spp. essential oils have insecticidal activity against *Plutella xylostella*. **Industrial Crops and Products**, v. 109, n. August, p. 374–383, 2017.

FURUIE, J. L. et al. Isolation of *Beauveria* Strains and Their Potential as Control Agents for *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae). **Insects**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2022.

GARRIDO-JURADO, I. et al. Soil drenching with entomopathogenic fungi for control of the soil-dwelling life stages and adults of the same generation of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 110, n. 2, p. 242–248, 2020.

INGLIS, G. D. et al. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**, n. 1993, p. 23–69, 2012.

ISLAM, W. et al. Insect-fungal-interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests. **Microbial Pathogenesis**, v. 159, n. March, p. 105122, 2021.

ITO, F. A. D.; PIMENTEL, I. C.; POINTEVIN, C. G. Niger seed agar as an inductor of sporulation of filamentous fungi with potential in biological control of agricultural diseases and pests. **International Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 3, p. 1509–1513, 2019.

JIANG, H.; VILCINSKAS, A.; KANOST, M. R. Chapter 10 Immunity in Lepidopteran insects. **Invertebrate Immunity**, p. 181–204, 2010.

KAISER, D.; BACHER, S.; MENÉ-SAFFRANÉ, L.; GRABENWEGER, G. Efficiency of natural substances to protect *Beauveria bassiana* conidia from UV radiation. **Pest Management Science**, 2018.

KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. **Journal of the American Statistical Association**, v. 53, n. 282, p. 457–481, 1958.

LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1–41, 2015.

LACEY, L. A.; SIEGEL, J. P. Safety and ecotoxicology of entomopathogenic bacteria. **Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application**, p. 253–273, 2000.

LACEY, L. A.; MERRITT, R. W. The safety of bacterial microbial agents used for black fly and mosquito. **Environmental Impacts of Microbial Insecticides**, p. 151–168, 2003.

MEYLING, N. V.; PELL, J. K. Detection and avoidance of an entomopathogenic

fungus by a generalist insect predator. **Ecological Entomology**, p. 162–171, 2006.

MOHAMMADBEIGI, A.; PORT, G. Effect of infection by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the feeding of *Uvarovistia zebra*. **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 4–7, 2015.

MONNERAT, R. et al. Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* cry toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7029–7035, 2006.

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.

OLIVEIRA, D. G. P. et al. Increased tolerance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* conidia to high temperature provided by oil-based formulations. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 151, n. February 2017, p. 151–157, 2018.

OPISA, S. et al. Effects of Entomopathogenic fungi and *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides on *Spoladea recurvalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 142, n. 6, p. 617–626, 2018.

PARRA, J. R. T. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 2001.

POITEVIN, C. G. et al. Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 53, n. 3, p. 323–331, 2018.

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.

ROBERTSON, J. L. et al. Bioassays with Arthropods. v. 05, p. 1997–1999, 2008.

ROBLES-ACOSTA, I. N. et al. Entomopathogenic Fungi as Biological Control Agents of *Phyllocoptruta oleivora* (Prostigmata: Eriophyidae) under Greenhouse Conditions. **Florida Entomologist**, v. 102, n. 2, p. 303–308, 2019.

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

RODRIGUES, P. R. **Potencial de fungos entomopatogênicos comerciais para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)**. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) –

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos 2019.

ROHLFS, M.; CHURCHILL, A. C. L. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 1, p. 23–34, 2011.

ROJAS, V. M. A. **Caracterização do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* quanto à produção de conídios, efeitos da radiação ultravioleta-B, temperatura alta e persistência em formulações do tipo dispersão oleosa**. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

RONDELLI, V. M. et al. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* potenciais para o controle da traça-das-crucíferas. **Horticultura brasileira**, v. 30, n. 1, p. 391–396, 2012.

SCHEMMER, R. et al. Natural Prevalence of Entomopathogenic Fungi in Hibernating Pupae of *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae) and Virulence of Selected Isolates. **Plant Protect. Sci.**, v. 52, p. 199–208, 2016.

SILVA, G. A. et al. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **Pest Management Science**, v. 67, n. 8, p. 913–920, 2011.

SOUZA, J. C. et al. Ocorrência de nova praga nas lavouras de morango no Sul de Minas. **EPAMIG. Circular Técnica, n.180**, n. 31, p. 5, 2013.

SRYGLEY, R. B. Ontogenetic changes in immunity and susceptibility to fungal infection in Mormon crickets *Anabrus simplex*. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 3, p. 342–347, 2012.

STOCKS, S. D.; HODGES, A. European Pepper Moth or Southern European Marsh Pyralid *Duponchelia fovealis* (Zeller). **Department of Entomology and Nematology; UF/IFAS Extension, Gainesville, FL 32611. Document EENY-508**, p. 10, 2013.

STUART, A. K. C.; FURUIE, J. L.; CATALDI, T. R.; STUART, R. M.; ZAWADNEAK, M. A. C.; LABATE, C. A.; PIMENTEL, I. C. Fungal consortium of two *Beauveria bassiana* strains increases their virulence, growth, and resistance to stress: A metabolomic approach. **Plos One**, v. 17, p. 17, 2022.

THOMAZONI, D.; FORMENTINI, M. A.; ALVES, L. F. A. Patogenicidade de isolados de fungos entomopatogênicos à *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 2, p. 126–133, 2014.

VEGA, F. E. et al. Fungal entomopathogens. **Insect Pathology**, 2012.

VINCENT, J. F. V.; WEGST, U. G. K. Design and mechanical properties of insect cuticle. **Arthropod Structure and Development**, v. 33, n. 3, p. 187–199, 2004.

XIONG, Q. et al. Morphological and ultrastructural characterization of *Carposina sasakii* larvae (Lepidoptera: Carposinidae) infected by *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales: Clavicipitaceae). **Micron**, v. 44, n. 1, p. 303–311, 2013.

ZAKI, O. et al. Limiting factors of mycopesticide development. **Biological Control**, v. 144, n. 2, p. 104220, 2020.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; BISCHOFF, A. *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae): nova praga no Brasil. **Universidade Federal do Paraná**, p. 19, 2014.

ZAWADNEAK, M. A. C. et al. First record of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia (Chile)**, v. 34, n. 3, p. 91–95, 2016.

ZAWADNEAK, M. A. C. et al. Biological parameters of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) reared in the laboratory on two diets. **European Journal of Entomology**, v. 114, n. 3 mL, p. 291–294, 2017.

ZAWADNEAK, M. A. C.; SCHUBER, J. M.; MÓGOR, Á. F. Como produzir morangos. **Curitiba: Editora UFPR**, v. 1, p. 296, 2018.

ZHANG, L.; SHI, W. B.; FENG, M. G. Histopathological and molecular insights into the ovicidal activities of two entomopathogenic fungi against two-spotted spider mite. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 117, n. 1, p. 73–78, 2014.

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

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): Biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 9, p. 865–901, 2008.

CAPÍTULO 03 - POTENCIAL DE MICROBIOLÓGICOS COMERCIAIS COMO ESTRATÉGIA DE CONTROLE DE *Duponchelia fovealis*

RESUMO

A lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae), é uma praga introduzida e responsável por danos significativos à cultura do morangueiro no Brasil e outras regiões produtoras do mundo. O seu controle no Brasil não está bem estabelecido. Resultados positivos com microrganismos entomopatogênicos em formulações comerciais poderão ampliar as recomendações para uma nova lista de pragas, de modo a viabilizar de maneira mais rápida seu uso por produtores agrícolas. Neste capítulo, avaliou-se a atividade inseticida de produtos comerciais a base de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea* sobre lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*. A concentração letal (CL₅₀), tempo letal (TL₅₀), tempo médio de sobrevivência (TMS) e susceptibilidade dos estágios larvais foram determinados para os isolados com mortalidade superiores a 80%. O produto comercial a base de *Bt* (subespécie *kurstaki*, isolado HD-1) apresentou maior patogenicidade, causando mortalidade superior a 90%, com valores de CL₅₀ de 70,84 µl/mL e TL₅₀ de 136,56 h. O TMS das lagartas tratadas com a CL₅₀ foi de 85,52 h após 7 dias de experimento. Observou-se que os estágios iniciais de desenvolvimento apresentaram maior letalidade, com taxas de mortalidade de 91,75% para o primeiro ínstar e de 79,79% para o segundo ínstar. Os dados deste trabalho sugerem que o produto comercial à base de *Bt* (subespécie *kurstaki*, isolado HD-1) têm elevada atividade inseticida contra *D. fovealis* e, portanto, têm aplicação potencial nos programas de manejo dessa praga no morangueiro.

Palavras-chave: Inseticidas microbiológicos; Controle microbiano; Microrganismos entomopatogênicos; *Bacillus thuringiensis*.

1. Introdução

O morango tem se destacado como uma das culturas de maior importância econômica no estado do Paraná, Brasil (ANTUNES; JÚNIOR; SCHWENGBER, 2016; ANTUNES; BONOW; JUNIOR, 2020; SEAB, 2021). Alguns insetos pragas são agentes nocivos ao seu cultivo e prejudicam a produção (BERNARDI; BOTTON; NAVA; ZAWADNEAKI, 2015; MACHADO, 2016; ZEIST, 2019). Dentre as pragas, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) foi relatada causando sérios problemas para a cultura do morango no Estado do Paraná, e por ser uma praga exótica no Brasil, não há registro de

produtos no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para seu controle (BERNARDI; BOTTON; NAVA; ZAWADNEAK, 2015; ZAWADNEAK et al., 2016; AGROFIT, 2022).

Estudos sobre monitoramento e métodos de controle estão sendo realizados com o intuito de encontrar medidas que possam minimizar as perdas ocasionadas por *D. fovealis* (BRAMBILA; STOCKS, 2010; STOCKS; HODGES, 2013). O uso crescente de agentes de controle biológico vem em resposta à necessidade de uma agricultura mais sustentável e segura para aplicadores, produção de alimentos e meio ambiente (LACEY; SIEGEL, 2000; LACEY; MERRITT, 2003; LACEY et al., 2015; ZAKI et al., 2020). Os inseticidas biológicos com microrganismos entomopatogênicos são utilizados há mais de 50 anos no país. Seu uso é uma alternativa para o controle de pragas agrícolas e está estritamente alinhada com os princípios do Manejo Integrado de Pragas (MIP) (BOBROWSKI et al., 2003; MATYJASZCZYK, 2015; MASCARIN et al., 2019).

Entre os microrganismos mais utilizados nas formulações, estão os fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* e a bactéria entomopatogênica *Bt* (KUMAR; SINGH, 2015; ANEJA; KHAN; ANEJA, 2016; DAMALAS, CHRISTOS; KOUTROUBAS, 2018; MASCARIN et al., 2019). Tais agentes de controle vem apresentando resultados promissores sobre lagartas de *D. fovealis* (AMATUZZI et al., 2018b; POITEVIN et al., 2018b; BAJA et al., 2020; PETRUCCI et al., 2020). Embora as condições nas estufas facilitem o uso de entomopatogênicos, problemas relacionados à perda de estabilidade, além dos aspectos físicos e químicos que causam a inativação das células dos microrganismos, são um dos principais fatores que limitam o uso desses agentes no campo (BOBROWSKI et al., 2003; RANGEL et al., 2015; KAISER; BACHER; MENÉ-SAFFRANÉ; GRABENWEGER, 2018; PARK et al., 2018).

No Brasil, aproximadamente 50% dos biopesticidas microbianos comercializados são a base de fungos, sendo as espécies *M. anisopliae* e *B. bassiana* as mais utilizadas (MASCARIN et al., 2019). No entanto, não existem atualmente trabalhos de seleção dos efeitos de produtos registrados contendo esses microrganismos em *D. fovealis*.

Um dos bioinseticidas mais conhecidos em todo o mundo é a base da bactéria entomopatogênica *Bt*, que tem mostrado resultados promissores em outros países onde *D. fovealis* está presente (POLANCZYK; ALVES, 2003;

VIANA et al., 2009). Resultados positivos com entomopatógenos em formulações comerciais poderá ampliar as recomendações para uma nova lista de pragas, de modo a viabilizar de maneira mais rápida seu uso por produtores no controle dessa praga agrícola.

Desta forma, objetivou-se avaliar o potencial de formulações comerciais a base de *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* e *Bt* em lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*. Os produtos com taxas de mortalidade superiores a 80% foram selecionados para determinação da concentração letal média, tempo letal médio e tempo de sobrevivência média. Em seguida, foi avaliado seu potencial de controle nos estágios larvais de *D. fovealis*.

2. Material e Métodos

2.1 Criação de *D. fovealis*

Os ovos, lagartas e pupas de *D. fovealis* foram obtidos a partir da criação estoque do laboratório de entomologia Professor Ângelo Moreira da Costa Lima da Universidade Federal do Paraná, estabelecido a partir de insetos silvestres coletados na região metropolitana de Curitiba (PR) e criados a 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa (UR) e 14 h de fotofase (ZAWADNEAK et al., 2017).

Os adultos foram mantidos em gaiolas plásticas (15 cm x 15 cm x 12,5 cm) alimentados com cerveja e solução nutritiva a base de levedo de cereveja e mel (ZAWADNEAK et al., 2017). As paredes das gaiolas foram revestidas com papel toalha para oviposição e trocadas diariamente. Tiras de papel toalha contendo ovos foram cortadas e transferidos para recipientes plásticos (7 cm x 4 cm x 4,5 cm) contendo dieta artificial para alimentação das lagartas após a eclosão dos ovos (ZAWADNEAK et al., 2017).

As pupas foram transferidas para placas de Petri estéreis (15 cm x 2 cm) com papel filtro e algodão úmido até emergência dos adultos.

2.2 Bioinseticidas

Foram utilizados produtos comerciais à base dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* e à base da bactéria entomopatogênica *Bt* (TABELA 1).

Os bioinseticidas foram mantidos em geladeira a temperatura de 4 °C ± 2 °C até o uso. Para cada produto, a solução foi diluída em água destilada autoclavada utilizando a máxima dosagem indicada na bula.

TABELA 1 – BIOINSETICIDAS TESTADOS CONTRA LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE *Duponchelia fovealis* EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.

Fabricante	Produto	Formulação	Entomopatógeno	Dose (Concentração)
Koppert do Brasil Holding LTDA	Boveril® WP PL63	Pó molhável	<i>Beauveria bassiana</i> (ESALQ PL63)	6,6 g/L (10 ⁵ conídios/mL)
	Metarril® WP E9	Pó molhável	<i>Metarhizium anisopliae</i> (ESALQ E9)	3 g/L (10 ⁵ conídios/mL)
	Octane®	Suspensão concentrada	<i>Isaria fumosorosea</i> (ESALQ 1296)	5 mL/L (10 ⁷ conídios/mL)
Oligos Biotecnologia	Beauveria Oligos®	Pó molhável	<i>Beauveria bassiana</i> (IBCB 66)	10 g/L (10 ⁷ conídios/mL)
	Metarhizium Oligos®	Pó molhável	<i>Metarhizium anisopliae</i> (IBCB 425a)	3.3 g/L (10 ⁷ conídios/mL)
Simbiose® Agrotecnologia Biológica	FlyControl®	Dispersão de óleo	<i>Beauveria bassiana</i> (Simbi BB 15)	2.5 mL/L (10 ⁶ conídios/mL)
	METHAControl®	Pó molhável	<i>Metarhizium anisopliae</i> (IBCB 425b)	8.5 g/L (10 ⁶ conídios/mL)
	IsaControl®	Dispersão de óleo	<i>Isaria fumosorosea</i> (ESALQ 4778)	5 mL/L (10 ⁷ conídios/mL)
	BTControl®	Suspensão concentrada	<i>Bacillus thuringiensis</i> (HD-1)	5 mL/L (88 UIP/mg)

FONTE: O autor (2022).

2.3 Viabilidade celular

Para avaliar a qualidade dos produtos comerciais a base de fungos entomopatogênicos antes de cada bioensaio foi realizado o teste de germinação de conídios. Nas formulações do tipo pó molhável e suspensão concentrada a

concentração dos conídios foram ajustadas em água destilada autoclavada em 10^6 conídios/mL (ROJAS, 2015). Já as formulações do tipo dispersão em óleo, 1 mL do produto foi transferido para tubo Eppendorf de 1,5 mL e centrifugado (80 – 2B, CENTRIBIO) por 5 minutos a 2,500 rotações por minuto (rpm). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo os conídios no fundo foram invertidos em papel filtro por 15 min para eliminar o óleo remanescente. Após esse período, foi adicionado 100 μ L do surfactante Silwet® com o objetivo de remover resíduos de óleo e, em seguida, os conídios foram ressuspensos em 1 mL de água destilada estéril com Tween 80 0,05%. A suspensão foi agitada em vórtex (772, Fisatom) por 2 minutos e ajustada na concentração de 10^6 conídios/mL (OLIVEIRA et al., 2015).

Posteriormente, foi inoculado 100 μ L de cada produto em placas de Petri contendo o meio Ágar Batata Dextrose (BDA-Sigma®) e espalhado com auxílio da alça de Drigalski.

As placas foram mantidas em condições controladas (28 ± 1 °C e 14 h de fotofase) por 18 horas e a porcentagem de germinação foi avaliada em microscópio óptico (400 \times) contando 200 esporos sendo considerados viáveis quando o tubo germinativo foi maior que o seu diâmetro (OLIVEIRA et al., 2015).

A determinação da qualidade do produto a base de *Bt* foi feita pela contagem do número de unidades formadoras de colônias/mL (UFC). Para isso, uma alíquota de 1 mL do produto comercial foi diluída em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina com 0,01% de Tween 80 (v/v). Em seguida, a solução foi homogeneizada em agitador de tubos, aquecida em banho maria (HH – S₃, Warmnest) à 80 °C por 12 minutos seguido de banho de gelo por 5 minutos. Foram realizadas 10 diluições seriadas e 100 μ L de cada diluição foi inoculada em triplicada em placas de Petri com meio Ágar Nutriente (KASVI®) e espalhado com auxílio da alça de Drigalski (MONNERAT et al., 2018, 2020).

As placas foram mantidas em estufa bacteriológica (30 ± 4 °C) por 24 h e as placas que apresentaram de 30 a 300 colônias de bactérias foram contadas. Os resultados foram expressos em UFC/mL (MONNERAT et al., 2020).

2.4 Bioensaio de patogenicidade

Os bioensaios foram realizados contra lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis* (POITEVIN et al., 2018). Em recipiente plástico de 500 mL com tampa perfurada foi colocada uma folha de morango desinfestada (ARAÚJO et al., 2002) com o pecíolo embrulhado em algodão e mergulhado em 15 mL de água para a hidratação dos folíolos.

Grupos de 10 lagartas foram adicionadas com auxílio de um pincel ponta fina em cada folha, as quais foram pulverizadas com pulverizador manual com 1 mL dos produtos na concentração indicada na tabela 1. Como controle negativo foi utilizado água destilada autoclavada.

Após a pulverização, os recipientes foram mantidos em condições controladas (25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de UR e 14 h de fotofase) e a mortalidade foi avaliada após 7 dias. Foram consideradas mortas as lagartas que não responderam ao estímulo proporcionado pelo toque de um pincel de cerdas finas.

Nos tratamentos com fungos, os insetos mortos foram transferidos para placas de Petri (15 cm × 2 cm) com papel filtro umedecido com água destilada autoclavada para extrusão do fungo e confirmação do agente causal.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada tratamento constou de cinco repetições com 10 insetos cada, e todo o experimento foi realizado duas vezes, totalizando 100 lagartas para cada microrganismo no final do experimento.

2.5 Bioensaio de estimativa da concentração letal média, tempo letal médio e tempo médio de sobrevivência de *D. fovealis*

Os isolados de fungos que causaram taxas de mortalidade superior a 80% das lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis* foram selecionados para cálculo de concentração letal média (CL₅₀) e tempo letal médio (TL₅₀), pois esse critério de eficiência é exigido pelo MAPA para registro de produtos como inseticidas (BACCI et al., 2007; SILVA et al., 2011; FILOMENO et al., 2017).

Para estimativa da CL₅₀, as concentrações dos produtos mais eficientes foram obtidas através da fórmula:

$$K = \frac{[\text{sup}] - [\text{inf}]}{n - 1}$$

onde:

K = intervalo entre as concentrações;

[sup] = concentração superior;

[inf] = concentração inferior;

n = número de concentrações.

Como controle negativo foi utilizado água destilada autoclavada. As lagartas de terceiro ínstar foram pulverizadas conforme metodologia descrita no item 2.4.

Para determinar o TL₅₀ e tempo médio de sobrevivência (TMS) foi utilizado a concentração encontrada da CL₅₀, o procedimento para a realização do bioensaio foi o mesmo descrito anteriormente e a avaliação foi feita diariamente por 7 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada tratamento constou de cinco repetições com 10 insetos cada, e todo o experimento foi realizado duas vezes, totalizando 100 lagartas para cada microrganismo no final do experimento.

2.6 Avaliação de virulência em diferentes estágios larvais de *D. fovealis*

As folhas com lagartas de 1º a 5º ínstar de *D. fovealis* foram pulverizadas com a concentração da CL₅₀ obtida dos produtos. A pulverização foi realizada conforme metodologia descrita no item 2.4 e as amostras foram mantidas em condições controladas (25 ± 2 °C, 70 ± 10% de UR e 14 h de fotofase). A mortalidade foi avaliada após 7 dias. Como controle negativo foi utilizado água destilada autoclavada.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada tratamento constou de cinco repetições com 10 insetos cada, e todo o experimento foi realizado duas vezes, totalizando 100 lagartas para cada microrganismo no final do experimento.

2.7 Análise estatística

A mortalidade das lagartas foi corrigida usando a fórmula de Abbott (ABBOTT, 1925):

$$Ma = \frac{(Mt - Mc)}{(100 - Mc)} \times 100$$

onde:

Ma = mortalidade corrigida em função do tratamento testemunha;

Mt = mortalidade observada no tratamento com formulados;

Mc = mortalidade observada no tratamento testemunha.

A normalidade dos dados obtidos foi avaliada com o teste de Shapiro-Wilk e, posteriormente, foram submetidos a análise de variância Kruskal-Wallis. As médias foram comparadas pelo teste Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DSCF). Os resultados foram analisados com o *software* R (R CORE TEAM, 2021).

Os dados de concentração letal e de tempo letal foram submetidos à análise de Probit através do *software* PoloPlus (ROBERTSON et al., 2008). As curvas de sobrevivência foram estimadas pelo teste de Kaplan-Meier (KAPLAN; MEIER, 1958) e comparadas pelo teste log-rank, usando o *software* Sigma plot.

3. Resultados

3.1 Bioensaio de patogenicidade

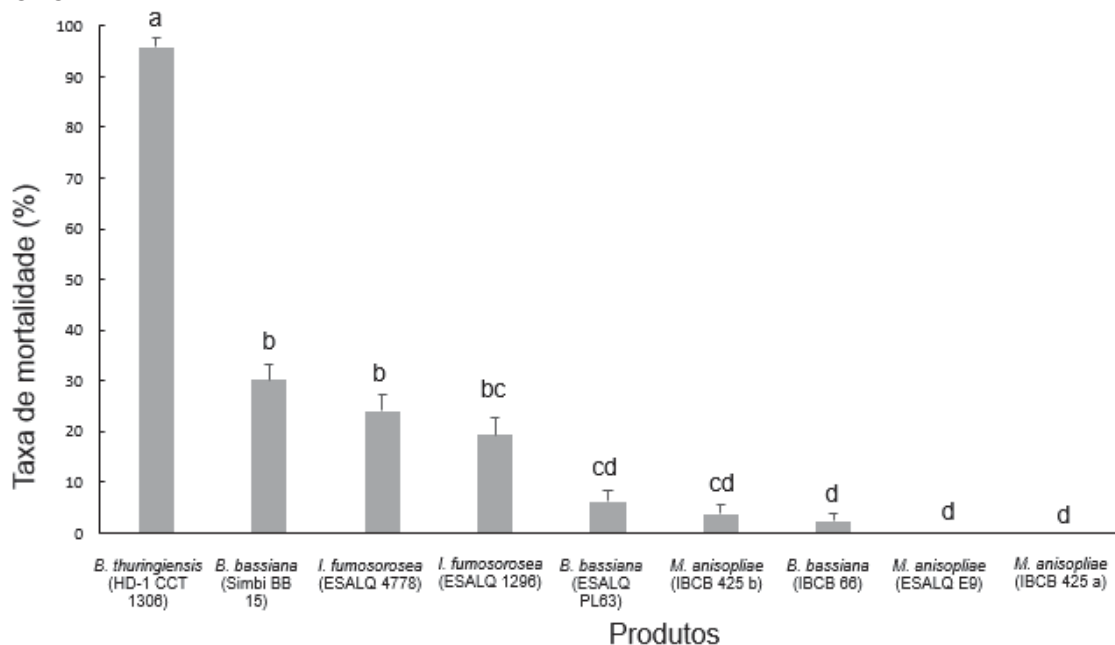
A taxa de germinação dos fungos utilizados nos produtos comerciais variou de 83,01% a 94,16%. A UCF do produto a base de *Bt* foi de $5,6 \times 10^9$ UFC/mL (TABELA 2). A mortalidade das lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis* variou de 0% a 95,9% (FIGURA 1). Apenas o produto comercial com *Bt* (FIGURA 1) causou taxas de mortalidade superiores a 80% ($\chi^2_{21,66} = 83$; $p < 0,01$). As lagartas mortas por *Bt* apresentaram perda do brilho no tegumento, adquirindo coloração marrom-escura e redução de tamanho (FIGURA 2). Todas as lagartas mortas pelos isolados fúngicos apresentaram extrusão confirmando o agente causal (FIGURA 2). O produto comercial com *Bt* foi selecionado para os testes posteriores.

TABELA 2 – VIABILIDADE (%) DOS PRODUTO COMERCIAIS. OS CONÍDIOS FÚNGICOS FORAM INOCULADOS EM MEIO BDA NA CONCENTRAÇÃO 1×10^6 CONÍDIOS/mL E AVALIADOS APÓS 18 HORAS DE DE INCUBAÇÃO A 28 ± 1 °C E 14 HORAS DE FOTOFASE. OS ESPOROS DE *Bacillus thuringiensis* FORAM INOCULADOS EM ÁGAR NUTRIENTE E AVALIADOS APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO A 30 ± 4 °C E CONTADOS NA DILUIÇÃO 1:10.000.000.

Entomopatígeno	Germinação (%) / UFC (mL)
<i>Beauveria bassiana</i> (ESALQ PL63)	90,01 \pm 0,24
<i>Metarhizium anisopliae</i> (ESALQ E9)	91,51 \pm 0,86
<i>Isaria fumosorosea</i> (ESALQ 1296)	92,12 \pm 0,95
<i>Beauveria bassiana</i> (IBCB 66)	86,33 \pm 0,88
<i>Metarhizium anisopliae</i> (IBCB 425a)	83,01 \pm 0,58
<i>Beauveria bassiana</i> (Simbi BB 15)	94,16 \pm 0,08
<i>Metarhizium anisopliae</i> (IBCB 425b)	91,02 \pm 1,15
<i>Isaria fumosorosea</i> (ESALQ 4778)	92,85 \pm 0,45
<i>Bacillus thuringiensis</i> (HD-1)	5,6 x 10 ⁹

FONTE: O autor (2022).

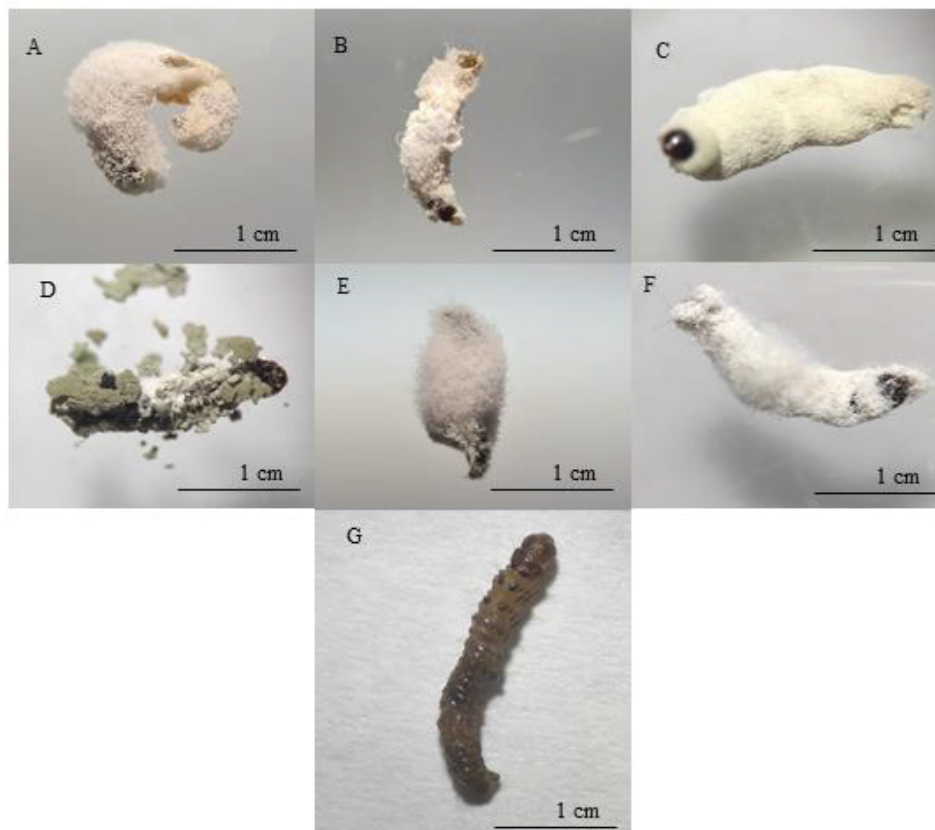
FIGURA 1 – MORTALIDADE (% MÉDIA \pm ERRO PADRÃO) DE LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE *Duponchelia fovealis* PULVERIZADAS COM OS PRODUTOS COMERCIAIS ESALQ PL63 E ESALQ E9 NA CONCENTRAÇÃO DE 10^5 CONÍDIOS/mL, Simbi BB 15 E IBCB 425b NA CONCENTRAÇÃO DE 10^6 CONÍDIOS/mL, IBCB 66, IBCB 425a, ESALQ 1296, ESALQ 4778 NA CONCENTRAÇÃO DE 10^7 CONÍDIOS/mL E HD-1 NA CONCENTRAÇÃO DE 88 UIP/mg, APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ DE UR e 14 HORAS DE FOTOFASE.



FONTE: O autor (2022).

NOTA: Barras com a mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste DSCF ($p < 0,01$).

FIGURA 2 – LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE *Duponchelia fovealis* EXTERIORIZANDO OS ISOLADOS FÚNGICOS PRESENTE NOS FORMULADOS COMERCIAIS BOVERIL® WP PL63 (A), BEAUVERIA OLIGOS® (B), FLYCONTROL® (C), METHACONTROL® (D), OCTANE® (E) E ISACONTROL® (F) APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO 25 ± 2 °C, $60 \pm 10\%$ DE UR E 12 HORAS DE FOTOFASE. LAGARTA DE TERCEIRO ÍNSTAR DE *Duponchelia fovealis* APÓS 5 DIAS DA APLICAÇÃO DE BTCONTROL (G). AUMENTO DE 20 \times .



FONTE: O autor (2022).

3.2 Bioensaio de estimativa da concentração letal média, tempo letal médio e tempo médio de sobrevivência de *D. fovealis*

Para estimativa da CL₅₀, sete concentrações do *Bt* foram testadas: 37,5; 56,25; 75; 93,75; 112,5; 131,29 e 150 $\mu\text{l/mL}$. A concentração necessária para o *Bt* causar mortalidade de 50% em lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis* foi de 70,84 $\mu\text{l/mL}$. Nessa concentração, o tempo necessário para causar 50% de mortalidade nas lagartas após 7 dias foi de 136,56 h (TABELA 2), e o TMS foi de 85,52 h. A probabilidade de sobrevivência de *D. fovealis* diminuiu de 100% para 0% após 168 h (FIGURA 3). Não houve mortalidade no grupo controle.

TABELA 3 – ANÁLISE DE PROBIT PARA ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA, TEMPO LETAL MÉDIO E TESTE LOG-RANK PARA ESTIMATIVA DO TEMPO MÉDIO DE SOBREVIVÊNCIA DO ISOLADO HD-1 DE *Bacillus thuringiensis* CONTRA LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE *Duponchelia fovealis*.

Tratamento	<i>B. thuringiensis</i> (Isolado HD-1)
N	634
CL ₅₀ ^a (IC 95% ^d)	70,84 (56,73 – 81,47)
Coefficiente angular (\pm EP ^e)	0,015 \pm 0,002
X ² (gl ^f = 5)	6,40
TL ₅₀ ^b (IC 95% ^d)	136,56 (125,76 – 150,72)
Coefficiente angular (\pm EP ^e)	0.24 \pm 0.027
X ² (gl ^f = 5)	4,52
TMS ^c (IC 95% ^d)	85,52 (74,55 – 96,49)

^a CL: Concentração letal (μ l /mL);

^b TL: Tempo letal (horas);

^c TMS: Tempo Médio de Sobrevivência;

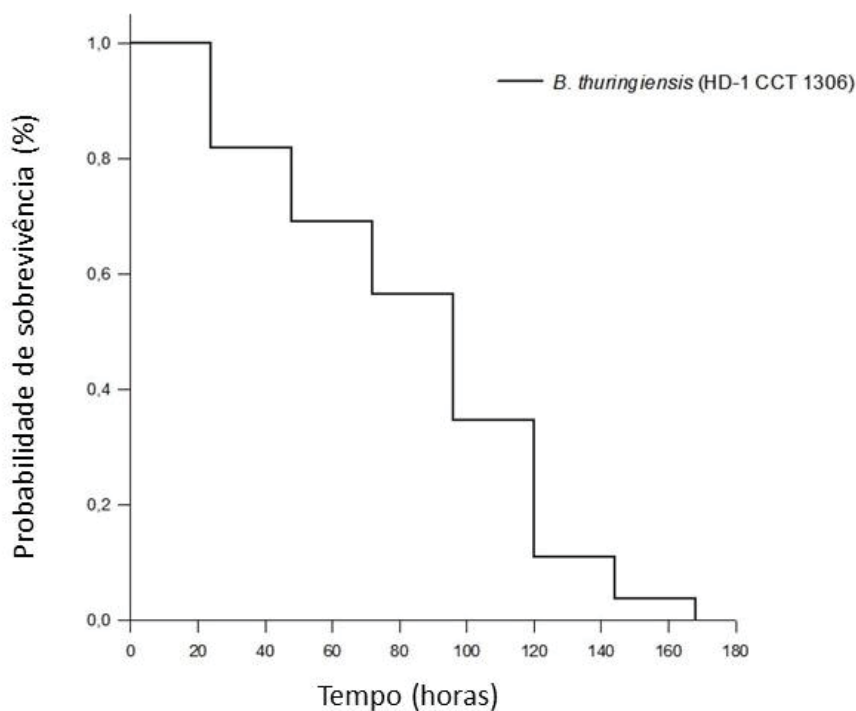
^d Intervalo de confiança;

^e Erro Padrão;

^f Grau de liberdade.

FONTE: O autor (2022).

FIGURA 3 – CURVA DE SOBREVIVÊNCIA (HORAS) DE LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE *Duponchelia fovealis* COM O ISOLADO HD-1 NA CONCENTRAÇÃO DE 70,84 μ l/mL DE *Bacillus thuringiensis* USANDO O TESTE KAPLAN-MEIER.

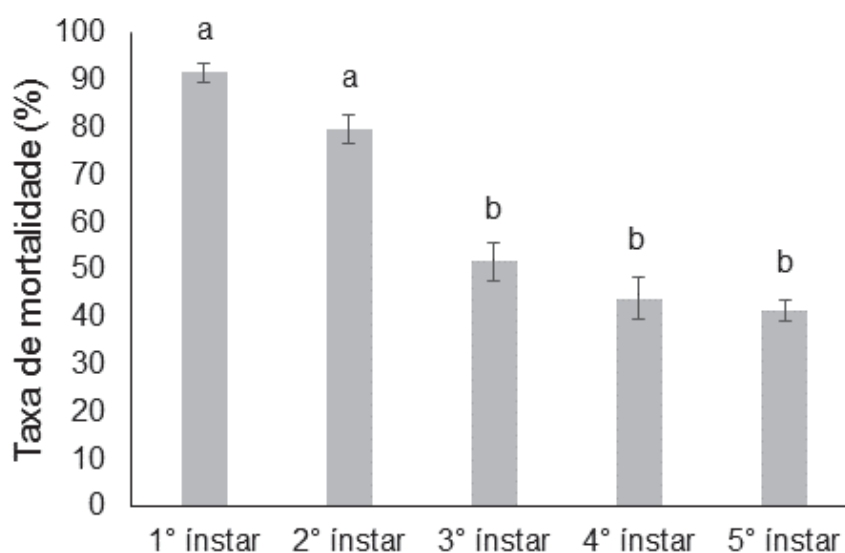


FONTE: O autor (2022).

3.3 Avaliação de virulência em diferentes estágios larvais de *D. fovealis*

O 1º e 2º ínstar foram os estágios de desenvolvimento mais afetados pelo tratamento, com taxa de mortalidade de 91,7% e 79,8%, respectivamente. A partir do estágio 3 de desenvolvimento, a mortalidade foi próxima a 50% não havendo diferença significativa entre os estágios mais avançados ($\chi^2_{13,27} = 38.1$; $p < 0,01$) (FIGURA 4).

FIGURA 4 – MORTALIDADE (% MÉDIA \pm ERRO PADRÃO) DE LAGARTAS DE *Duponchelia fovealis* PULVERIZADAS COM O PRODUTO COMERCIAL A BASE DE *Bacillus thuringiensis* (LINHAGEM HD-1) NA CONCENTRAÇÃO DE 70,84 $\mu\text{l}/\text{mL}$, APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ DE UR e 14 HORAS DE FOTOFASE.



FONTE: O autor (2022).

NOTA: Barras com a mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste DSCF ($p < 0.01$).

4. Discussão

O controle microbiano representa um ramo do controle biológico que trata da utilização de bactérias, fungos, vírus e nematóides para o controle de insetos pragas (FONTES, 2020). Os benefícios relacionados aos biopesticidas para a população e meio ambiente estão aumentando progressivamente a participação desses insumos no mercado como alternativa aos pesticidas químicos (MASCARIN et al., 2019; ISLAM et al., 2021). Além disso, o uso alternado de pesticidas microbianos e químicos podem reduzir o risco de

desenvolvimento de resistência a inseticidas e oferecer benefícios significativos no controle de pragas a longo prazo dentro do MIP (DARA et al., 2018).

Diversas espécies de microrganismos entomopatogênicos já foram avaliados quanto ao seu potencial no controle de pragas agrícolas. No entanto, os estudos sobre a suscetibilidade de *D. fovealis* a produtos biológicos já comercializados são recentes. Este estudo é a primeira avaliação de inseticidas microbianos comerciais contra *D. fovealis*. Os resultados desse estudo indicaram que dos nove produtos comerciais testados, apenas o bioinseticida a base da bactéria *Bt*, foi altamente patogênico, causando 95,9% de mortalidade das lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*, taxa superior aos demais biológicos estudados.

A suscetibilidade de *D. fovealis* ao *Bt* confirma a eficácia dessa bactéria no controle da praga (PETRUCCI et al., 2020). Já existem estudos demonstrando a suscetibilidade ao *Bt* de outras espécies de lepidópteros, como *Spodoptera frugiperda* JE Smith, *Helicoverpa armigera* Hübner e *Spodoptera litura* Fabricius (REGODE et al., 2016; SILVA et al., 2016; VINEELA et al., 2017).

A subespécie *kurstaki* HD-1, isolado comercial utilizado nesse estudo, também foi eficaz contra adultos da lagarta desfolhadora de dendezeiro *Euprosterina elaeasa* Dyar (Lepidoptera: Limacodidae) em estudo de laboratório e campo (PLATA-RUEDA et al., 2020), e causou graves alterações histológicas do intestino médio de lagartas de quarto ínstar de *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), praga desfolhadora da soja (CASTRO et al., 2019).

Neste trabalho, a subespécie *kurstaki* HD-1 causou mortalidade em *D. fovealis* de forma dependente da concentração, conforme já demonstrado para outras pragas agrícolas desfolhadoras, constatando a toxicidade desta bactéria por ingestão (FERNÁNDEZ-CHAPA; RAMÍREZ-VILLALOBOS; GALÁN-WONG, 2019; PLATA-RUEDA et al., 2020; SENA DA SILVA, 2021). A concentração letal necessária para causar 50% de mortalidade na população de *D. fovealis* foi inferior (70,84 µl/mL) a dosagem máxima recomendada em bula pelo fabricante (150 µl/mL) para as pragas lepidópteras *Helicoverpa armigera* e *Chrysodeixis includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae).

O tempo para reduzir em 50% a população inicial de *D. fovealis* foi de 136,56 h. Também foi possível estabelecer uma curva de sobrevivência das lagartas quando tratadas com o valor da CL₅₀ do produto, sendo 85,52 h o tempo

que o produto a base de *Bt* levou para reduzir em 42% a chance de sobrevivência da população inicial utilizada no experimento. Conforme observado para outras espécies de lepidópteros, a sobrevivência de *D. fovealis* também está associada com o rápido efeito da interação das proteínas Cry com as células do intestino médio após a ingestão de *Bt* (CASTRO et al., 2019; PLATA-RUEDA et al., 2020). Outros estudos demonstram diferentes tempos de sobrevivência da lagarta da urtiga, *Euprosterina elaeasa* Dyar (Lepidoptera: Limacodidae) quando submetida a isolados comerciais de *Bt*, dentre eles a subespécie *kurstaki* HD-1 que diminuiu em 35,62% as chances de sobrevivência da lagarta (PLATA-RUEDA et al., 2020). As diferenças no tempo de sobrevivência observadas entre as espécies de insetos quando tratadas com *Bt* podem estar associadas com as variações de delta-endotoxinas entre os isolados de *Bt* (LIAO et al., 2005) e com a resposta do sistema imunológico da praga alvo (MAHBUBUR RAHMAN; ROBERTS; SCHMIDT, 2007). Nesse sentido, uma rápida atividade inseticida de *Bt* sobre lagartas de *D. fovealis* durante os primeiros dias de infestação é essencial para a proteção do morangueiro.

A toxicidade de *Bt* também foi verificada nos diferentes estágios de desenvolvimento de *D. fovealis* na concentração de 70,84 µl/mL. A mortalidade foi superior ou próxima a 80% no primeiro e segundo ínstar e menor no terceiro, quarto e quinto estágio de vida da lagarta. Da mesma forma, Petrucci et al (2020) observaram mortalidade superior a 50% nos estágios mais jovens de *D. fovealis*, porém mortalidade inferior a 5% no quarto ínstar de *D. fovealis* quando submetidas à duas formulações com *Bt*, Agree® (subespécie *aizawai* isolado GC 91) e Dipel® (subespécie *kurstaki*, isolado HD-1), que são utilizadas no controle desta lagartas em países do continente europeu. A diferença na eficácia e toxicidade entre os produtos utilizados pode está relacionada com a composição dos cristais de *Bt*, ativação da proteína e a conexão da toxina ativa com receptores das células intestinais da praga-alvo (POLANCZYK; ALVES, 2003).

Nossos resultados indicam que a bactéria possui maior eficiência quando aplicada nos estágios iniciais do desenvolvimento da lagarta, pois a mesma possui um pH intestinal básico, condição que favorece a ação das proteínas de *Bt*. Além disso, as alterações na solubilização das protoxinas em pH menos alcalino também podem contribuir na ocorrência de alterações no grau

de toxicidade das proteínas Cry (COLMENAREZ, 2003; SILVA; CARVALHO, 2004; BELTRÃO, 2006; LIMA, 2010; SENA DA SILVA, 2021).

Apesar de até o momento não existirem estudos das alterações citopatológicas no intestino médio de lagartas de *D. fovealis* e de qual receptor celular das células intestinais dessa praga estão envolvidos na conexão com as toxinas Cry, formulações a base de *Bt* foram utilizados como tratamento preventivo de lagartas de *D. fovealis* em estudos realizados na Califórnia em 2010 (BETHKE; VANDER MEY, 2010) e também são recomendadas como larvicidas em alguns países do continente europeu (MURPHY, 2008; PETRUCCI et al., 2020). O tratamento com *Bt* também é recomendado nos estágios iniciais do desenvolvimento de *D. fovealis*, uma vez que lagartas mais desenvolvidas apresentam o hábito críptico (BETHKE; VANDER MEY, 2010).

O isolado HD-1 é um dos mais estudados e apresenta uma variedade de genes Cry contra lepidópteros, como as toxinas Cry 1 Aa, Cry 1 Ab, Cry 1 Ac, Cry 1 Ia, Cry 2 Aa e Cry 2 Ab. Essa variação é determinante para a seletividade da atividade inseticida, cada uma com nível de toxicidade diferente para diferentes espécies de insetos (FERNÁNDEZ-CHAPA; RAMÍREZ-VILLALOBOS; GALÁN-WONG, 2019). As toxinas Cry produzidas pela subespécie *kurstaki* HD-1 foram prejudiciais para *D. fovealis* nesse e em outros estudos mesmo sendo comercializada em diferentes tipos de formulações.

O intestino médio de lepidópteros tem origem endodérmica e consiste em um epitélio pseudoestratificado, sendo composto por três células epiteliais principais: células colunares, células calciformes e células-tronco (LOEB et al., 2001). A região apical dessas células apresenta microvilosidades e estão envolvidas na digestão, absorção de nutrientes, água e secreção de líquidos. (LOEB et al., 2001; KNAAK; FIUZA, 2010). As toxinas produzidas por *Bt* atingem principalmente as células colunares, ligando-se aos receptores específicos que estão presentes nas microvilosidades (LOEB et al., 2001).

Atualmente, dois modelos têm sido utilizados para descrever o mecanismo de ação das proteínas Cry em lagartas da ordem Lepidoptera. Ambos foram propostos para descrever a atividade da toxina Cry 1 Ab. Segundo o modelo de ligação sequencial estudado em lagartas de *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) proposto por Bravo et al. (2007), o cristal proteico após ingerido é dissolvido em pH alcalino liberando as protoxinas. Em seguida, as

protoxinas são processadas e ativadas por proteases presentes no lúmen do intestino médio, liberando o fragmento tóxico ativo. Após processo de ativação, as proteínas Cry interagem com os receptores do tipo aminopeptidase N (APN) e fosfatase alcalina (ALP) que estão ligadas à membrana por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e uma proteína do tipo caderina (CADR) (CORREA, 2012). Inicialmente a toxina ativa liga-se a CADR, sofre clivagem por proteases da membrana resultando na formação de um complexo pré-poro em formato tetrâmico. Tal estrutura ganha afinidade pelos receptores ancorados ao GPI, e em seguida, ocorre a inserção da toxina na membrana de forma irreversível, causando a formação de poros que desregula o balanço osmótico celular, causa lise da célula e morte do inseto por septicemia (LIMA, 2010; CORREA, 2012; SENA DA SILVA, 2021).

O outro modo de ação proposto para as toxinas Cry é a transdução de sinal descrita por Zhang et al (2006). Neste modelo, a proteína Cry liga-se a caderina iniciando uma cascata de sinalização dependente de Mg^{2+} que estimula a síntese de proteína G e esta por sua vez estimula a produção da proteína adenilato ciclase (ZHANG et al., 2006; SENA DA SILVA, 2021). A ativação dessas proteínas promove a produção e acúmulo de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMP cíclico) intracelular ocasionando a ativação da proteína quinase A (PKA). Uma vez ativada, a proteína PKA desestabiliza as células do citoesqueleto e os canais iônicos da membrana celular levando a morte das células (ZHANG et al., 2006; CORREA, 2012; SENA DA SILVA, 2021) .

Os resultados dessa pesquisa também mostraram que os bioinseticidas a base dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *I. fumosorosea* não apresentaram taxas de mortalidade significativas para as lagartas de *D. fovealis*, sendo inferior a 40%. Os produtos comerciais com *B. bassiana* atuam no controle da cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae), ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), broca-do-café *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae), mosca-branca *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae), gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), bicudo da cana de açúcar *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) e moleque da bananeira *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). Enquanto que, os bioinseticidas com isolados de *I. fumosorosea*, atuam no controle de *Helicoverpa*

armigera Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). O baixo desempenho encontrado nos testes contra *D. fovealis* pode estar relacionado à seletividade desses isolados para hospedeiros específicos como alvos (DALZOTO; UHRY, 2009; ISLAM et al., 2021). Por conta da grande variabilidade genética de isolados de uma mesma espécie, um mesmo patógeno fúngico pode apresentar ação diferente sobre hospedeiros distintos. Além disso, os distúrbios fisiológicos gerados podem ter relação direta com a dose à qual o hospedeiro foi submetido (ZIMMERMANN, 2008; RODRIGUES, 2019). Desta maneira, o uso das concentrações utilizadas nesse trabalho pode fazer com que esses produtos necessitem de dosagens maiores para o controle efetivo da praga.

Nesse estudo, dois produtos comerciais que utilizam isolados de *M. anisopliae* não induziram mortalidade nas lagartas. Isso difere de outro estudo de controle biológico que relata altas taxas de mortalidade e atraso no desenvolvimento da lagarta desfolheadora de plantas ornamentais *Ocinara varians* Walker (Lepidoptera: Bombycidae) por esta espécie de fungo (HUSSAIN et al., 2009; NUSSENBAUM; LECUONA, 2012). Todavia, estudos com a lagarta das crucíferas *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) (GODONOU et al., 2009) e lagartas de *D. fovealis* em lavouras de batata-doce mostrou resultados semelhantes a este trabalho para isolados de *M. anisopliae* (PUTNOKY-CSICSÓ et al., 2022).

O baixo desempenho dos isolados de *M. anisopliae* em relação aos demais isolados comerciais pode ser devido a baixa adesão das proteínas que compõe a membrana dos esporos dessa espécie fúngica no tegumento das lagartas de *D. fovealis* (MOONJELY; BARELLI; BIDOCHKA, 2016; AMATUZZI et al., 2018a; WANG; LOVETT; ST. LEGER, 2019). A seletividade dos esporos de *M. anisopliae* para determinados grupos de insetos, principalmente coleópteros, ocorre durante o processo de colonização da cutícula através da regulação na secreção de proteases que é dependente do hospedeiro (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010; ISLAM et al., 2021).

Além disso, a fixação e germinação dos esporos fúngicos na superfície do tegumento do inseto não garante o êxito na infecção, já que, para infectar o hospedeiro o fungo necessita estar no interior do artrópode. Os esporos dos fungos nos produtos biológicos utilizados neste trabalho apresentaram taxas de germinação satisfatória (>80%) nos testes de viabilidade por método de

contagem direta (MASCARIN et al., 2019). A quantificação bacteriana total no produto a base de *Bt* apresentou boa taxa populacional de $5,6 \times 10^9$ UFC/mL, sendo qualquer quantidade de unidades formadoras de colônia considerado um resultado adequado, pois importa a presença da bactéria que está sendo utilizada como controle (MONNERAT et al., 2018, 2020).

Os resultados apresentados nesse estudo mostram que *Bt* subespécie *kurstaki* isolado HD-1 afeta lagartas de *D. fovealis*. Suas toxinas demonstram grande potencial desse microrganismo no controle de insetos nocivos para a saúde humana e para a agricultura (FERNÁNDEZ-CHAPA; RAMÍREZ-VILLALOBOS; GALÁN-WONG, 2019; MASCARIN et al., 2019). Para um controle mais significativo, recomenda-se a aplicação do bioinseticida principalmente nos primeiros estágios de vida da lagarta.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. The Value of the Dry Substitutes for Liquid Lime. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265–267, 1925.

AGROFIT. **AGROFIT — Português (Brasil)**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>>. Acesso em: 8 set. 2021.

ALVES, R. T.; FARIA, M. Pequeno Manual Sobre Fungos Entomopatogênicos. **Embrapa Cerrados**, p. 47, 2010.

AMATUZZI, R. F. et al. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to soil-borne entomopathogenic fungi. **Insects**, v. 9, n. 2, 2018a.

AMATUZZI, R. F. et al. Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera:Crambidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 3, p. 429–435, 2018b.

ANEJA, K. R.; KHAN, S. A.; ANEJA, A. Biopesticides an eco-friendly pest management approach in agriculture: status and prospects. **Kavaka**, v. 154, p. 145–154, 2016.

ANTUNES, CORRÊA EDUARDO LUIS; BONOW, S.; JUNIOR, REISSER. Morango crescimento constante em área e produção. **Embrapa Clima Temperado (CPACT)**, v. 37, n. 2316–6304, p. 88–92, 2020.

ANTUNES, L. E. C.; JÚNIOR, C. R.; SCHWENGBER, J. E. **Morangueiro**. 1. ed. 2016.

ARAÚJO, W. L. DE et al. Manual: isolamento de microrganismos endofíticos.

CALQ, 2002.

BACCI, L. et al. Toxicity of insecticides to the sweet potato whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) and its natural enemies. **Pest Management Science**, v. 63, n. 7, p. 699–706, jul. 2007.

BAJA, F. et al. Infection of *Beauveria bassiana* and *Cordyceps javanica* on different immature stages of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). **Crop Protection**, v. 138, n. June, 2020.

BELTRÃO, H. D. B. M. **Interação das toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* com o mesêntero de larvas do vetor *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. 96 f. Dissertação (Mestrado em saúde pública) – Departamento de Entomologia, Fiocruz, Recife, 2006.

BERNARDI, D.; BOTTON, M.; NAVA, D.; ZAWADNEAKI, M. A. C. Guia para a identificação e monitoramento de pragas e seus inimigos naturais em morangueiro. **Embrapa**, 2015.

BETHKE, J. A.; VANDER MEY, B. Pest Alert *Duponchelia fovealis*. **University of California Cooperative Extension San Diego**, n. June, p. 2–3, 2010.

BOBROWSKI, V. L. et al. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas *Bacillus thuringiensis* genes: an approach to confer insect resistance to plants. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 843–850, 2003.

BRAMBILA, J.; STOCKS, I. The European pepper moth, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a Mediterranean pest moth discovered in central Florida. **Pest Alert DACS-P-01752, Florida Dept. of Agric. and Consumer Services, Div. Plant Industry**, n. December 2016, p. 1–4, 2010.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423–435, 2007.

CASTRO, B. et al. Toxicity and cytopathology mediated by *Bacillus thuringiensis* in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Scientific Reports**, v. 9, n. 6667, 2019.

COLMENAREZ, Y. C. **Virulência de *Thyrinteina arnobia* virus (TaV) e de *Bacillus thuringiensis* à *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae): efeito da temperatura no desenvolvimento das lagartas e do pH da calda de pulverização**. 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Ciências Agrônomicas da UNESP, Botucatu, 2003.

CORREA, R. F. T. **Avaliação da toxicidade de proteínas Cry e Cyt de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* para diferentes linhagens de células de inseto e de mamífero**. 127 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Departamento de Biologia celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

DALZOTO, P. R.; UHRY, K. F. Controle biológico de pragas no Brasil por meio

- de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill 37. **Biológico**, v. 71, n. 1, p. 37–41, 2009.
- DAMALAS, C. A.; KOUTROUBAS, S. D. Current Status and Recent Developments in Biopesticide Use. **Agriculture**, v. 8, n. 13, 2018.
- DARA, S.K., PECK, D., MURRAY, D. Chemical and non-chemical options for managing twospotted spider mite, western tarnished plant bug and other arthropod pests in strawberries. **Insects** v. 9, n. 10, 2018.
- FERNÁNDEZ-CHAPA, D.; RAMÍREZ-VILLALOBOS, J.; GALÁN-WONG, L. Toxic Potential of *Bacillus thuringiensis*: An Overview . **Protecting Rice Grains in the Post-Genomic Era**, p. 1–22, 2019.
- FILOMENO, C. A. et al. *Corymbia* spp. and *Eucalyptus* spp. essential oils have insecticidal activity against *Plutella xylostella*. **Industrial Crops and Products**, v. 109, n. August, p. 374–383, 2017.
- FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Controle biológico de pragas agrícolas**. v. 148, 2020.
- GODONOU, I. et al. Potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates from Benin to control *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). **Crop Protection**, v. 28, n. 3, p. 220–224, 2009.
- HUSSAIN, A. et al. Entomopathogenic fungi disturbed the larval growth and feeding performance of *Ocinara varians* (Lepidoptera: Bombycidae) larvae. **Insect Science**, v. 16, p. 511–517, 2009.
- ISLAM, W. et al. Insect-fungal-interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests. **Microbial Pathogenesis**, v. 159, n. March, p. 105122, 2021.
- KAISER, DEBORAH; BACHER, SVEN; MENÉ-SAFFRANÉ, LAURENT; GRABENWEGER, G. Efficiency of natural substances to protect *Beauveria bassiana* conidia from UV radiation. **Pest Management Science**, v. 752, p. 556–563, 2018.
- KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. **Journal of the American Statistical Association**, v. 53, n. 282, p. 457–481, 1958.
- KNAAK, N.; FIUZA, L. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120–132, 2010.
- KUMAR, S.; SINGH, A. Biopesticides: Present Status and the Future Prospects. **Journal of Fertilizers & Pesticides**, v. 06, n. 02, 2015.
- LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1–41, 2015.
- LACEY, L. A.; SIEGEL, J. P. Safety and ecotoxicology of entomopathogenic

bacteria. **Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application**, p. 253–273, 2000.

LACEY, L. A.; MERRITT, R. W. The safety of bacterial microbial agents used for black fly and mosquito. **Environmental Impacts of Microbial Insecticides**, p. 151–168, 2003.

LIAO, C. et al. Binding of Cry δ -endotoxins to brush border membrane vesicles of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Science**, v. 12, n. 4, p. 231–240, 2005.

LIMA, G. M. S. Proteínas bioinseticidas produzidas por *Bacillus thuringiensis*. **Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 7, p. 119–137, 2010.

LOEB, M. J. et al. Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 6, p. 599–606, 2001.

MACHADO, J. Strawberry cultivation in Brazil. **Revista Geama**, v. 2, n. 3, p. 230–238, 2016.

MAHBUBUR RAHMAN, M.; ROBERTS, H. L. S.; SCHMIDT, O. Tolerance to *Bacillus thuringiensis* endotoxin in immune-suppressed larvae of the flour moth *Ephestia kuehniella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, n. 2, p. 125–132, 2007.

MASCARIN, G. M. et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 165, n. December 2017, p. 46–53, 2019.

MATYJASZCZYK, E. Products containing microorganisms as a tool in integrated pest management and the rules of their market placement in the European Union. **Pest Management Science**, v. 71, n. 9, p. 1201–1206, 2015.

MONNERAT, R. et al. Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* para uso na agricultura. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p. 34, 2018.

MONNERAT, R. et al. Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. **Documentos Embrapa**, v. 369, p. 46, 2020.

MOONJELY, S.; BARELLI, L.; BIDOCHKA, M. J. Insect Pathogenic Fungi as Endophytes. **Advances in Genetics**, v. 94, p. 107–135, 2016.

MURPHY, G. **An overview of *Duponchelia* control options - Greenhouse Canada**. Disponível em: <<https://www.greenhousecanada.com/an-overview-of-duponchelia-control-options-1424/>>. Acesso em: 22 abr. 2022.

NUSSENBAUM, A. L.; LECUONA, R. E. Selection of *Beauveria bassiana* sensu lato and *Metarhizium anisopliae* sensu lato isolates as microbial control agents against the boll weevil (*Anthonomus grandis*) in Argentina. **Journal of**

Invertebrate Pathology, v. 110, n. 1, p. 1–7, 2012.

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.

PARK, S. E. et al. Solid cultures of thrips-pathogenic fungi *Isaria javanica* strains for enhanced conidial productivity and thermotolerance. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 21, n. 4, p. 1102–1109, 2018.

PETRUCCI, K. P. O. S. et al. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae). **Nucleus**, v. 17, n. 1, p. 293–304, 2020.

PLATA-RUEDA, A. et al. Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains on the Nettle Caterpillar, *Euprosterina elaeasa* (Lepidoptera: Limacodidae). **Insects**, v. 11, n. 310, 2020.

POITEVIN, C. G. et al. Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 53, n. 3, p. 323–331, 2018.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma Breve Revisão. **Agrociencia**, v. 7, n. 2, p. 1–10, 2003.

PUTNOKY-CSICSÓ, B. et al. Entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (strain NCAIM 362) effects on soil inhabiting *Melolontha melolontha* (Coleoptera) and *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera) larvae in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). **Plant Protection Science**, v. 58, n. 3, p. 264–268, 2022.

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.

RANGEL, D. E. N. et al. Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 383–404, 2015.

REGODE, V. et al. Isolation and characterization of gut bacterial proteases involved in inducing pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* toxin in Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. OCT, p. 1–11, 2016.

ROBERTSON, J. L., RUSSELL, R. M., PREISLER, H. K.; SAVIN, E. Bioassays with Arthropods. v. 05, p. 1997–1999, 2008.

RODRIGUES, P. R. **Potencial de fungos entomopatogênicos comerciais para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)**. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos 2019.

ROJAS, V. M. A. **Caracterização do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* quanto à produção de conídios, efeitos da radiação ultravioleta-B, temperatura alta e persistência em formulações do tipo dispersão oleosa.** 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

SEAB. **Secretaria da Agricultura e do Abastecimento.** Disponível em: <<https://www.agricultura.pr.gov.br/>>. Acesso em: 8 set. 2021.

SILVA, H. **Mechanism of action of Cry1Ac toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae).** 117 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Departamento de agricultura e ciências veterinária, Jaboticaba, 2021.

SILVA, G. A. et al. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **Pest Management Science**, v. 67, n. 8, p. 913–920, 2011.

SILVA, K. F. D. et al. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Field Populations to the Cry1F *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Protein. **Florida Entomologist**, v. 99, n. 4, p. 629–633, 2016.

SILVA, L. K. F.; CARVALHO, A. G. Patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1909) em lagartas de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera, hesperiidae). **Instituto de biologia**, v. 71, n. 2, p. 249–252, 2004.

STOCKS, S. D.; HODGES, A. European Pepper Moth or Southern European Marsh Pyralid *Duponchelia fovealis* (Zeller). **Department of Entomology and Nematology; UF/IFAS Extension, Gainesville, FL 32611. Document EENY-508**, p. 10, 2013.

VIANA, C. L. T. et al. Efeito de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner em *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) Effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner new strains against *Plutella xylostella*. **Biologia**, n. January, p. 22–31, 2009.

VINEELA, V. et al. Enhanced bioefficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) through particle size reduction and formulation as a suspension concentrate. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 58–69, 2017.

WANG, J.; LOVETT, B.; ST. LEGER, R. J. The secretome and chemistry of *Metarhizium*; a genus of entomopathogenic fungi. **Fungal Ecology**, v. 38, p. 7–11, 2019.

ZAKI, O. et al. Limiting factors of mycopesticide development. **Biological Control**, v. 144, n. April 2019, p. 104220, 2020.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; BISCHOFF, A. *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae): nova praga no Brasil. **Universidade Federal do Paraná**, p. 19, 2014.

ZAWADNEAK, M. A. C. et al. First record of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia (Chile)**, v. 34, n. 3, p. 91–95, 2016.

ZAWADNEAK, M. A. C. et al. Biological parameters of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) reared in the laboratory on two diets. **European Journal of Entomology**, v. 114, n. 3 mL, p. 291–294, 2017.

ZEIST. Strawberry breeding in Brazil: current momentum and perspectives. **Horticultura brasileira**, p. 7–16, 2019.

ZHANG, X. et al. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 26, p. 9897–9902, 2006.

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): Biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 9, p. 865–901, 2008.

CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou o potencial de nove linhagens de *B. bassiana* isoladas a partir de insetos adultos de *L. bilineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) contra o terceiro ínstar da lagarta-da-coroa, *D. fovealis*. Dois isolados se destacaram por apresentarem taxas de mortalidade superiores a 80%, os isolados 4485 e 4488.

O estudo também avaliou o potencial de controle de nove inseticidas microbianos comerciais contra as lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*. Apenas um produto comercial à base de *Bt* subespécie *kurstaki* isolado HD-1 apresentou elevada atividade inseticida contra as lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*, com taxas de mortalidade superiores a 95%.

O isolado de *B. bassiana* 4488 apresentou maior toxicidade, com o valor da CL₅₀ de $3,3 \times 10^6$ conídios/mL e menor TL₅₀ de 143,52 h quando comparado ao isolado 4485, com CL₅₀ de $1,7 \times 10^7$ conídios/mL e TL₅₀ de 145,2 h. Entretanto, após sete dias, o tempo médio de sobrevivência das lagartas foi menor para o isolado 4485, com o valor do TMS de 106,56 h e maior para 4488 com um TMS de 143,52 h.

O produto comercial à base de *Bt* requereu uma concentração menor (70 µL/mL) para atingir a CL₅₀ do que a indicada pelo fabricante para as pragas lepidópteras *Helicoverpa armigera* e *Chrysodeixis includens* (150 µL/mL), TL₅₀ de 136,56 h e TMS de 85,52 h.

Os isolados fúngicos 4485 e 4488 de *B. bassiana* e o produto comercial com *Bt* apresentaram maiores taxas de controle no primeiro e segundo ínstar de desenvolvimento das lagartas, quando submetidos aos valores da concentração letal média, demonstrando que a imunidade deste inseto é modificada ao longo de seu desenvolvimento. Além disso, o estudo fornece evidências de que os dois isolados fúngicos, 4485 e 4488, interferiram na viabilidade de ovos e pupas de *D. fovealis*.

Dessa forma, o uso dos fungos entomopatogênicos demonstra ser uma estratégia promissora no manejo de *D. fovealis*, e por serem agentes de controle que apresentam baixo risco a saúde humana e ao meio ambiente, podem ser usadas em sistemas de produção orgânica de morango. Novos estudos são

necessários para avaliar a combinação desses agentes com produtos que possibilitem a utilização no controle de *D. fovealis* no campo.

A pesquisa também contribuiu para o conhecimento de novas possibilidades no uso de insumos biotecnológicos já existentes, que podem compor estratégias de manejo de pragas na cultura do morangueiro, de modo a reduzir o uso de produtos químicos, contribuindo para uma cultura mais saudável no Brasil. Este é o primeiro estudo sobre fungos entomopatogênicos isolados de coleóptero e produtos comerciais testado contra *D. fovealis*.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. The Value of the Dry Substitutes for Liquid Lime. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265–267, 1925.

AGROFIT. **AGROFIT — Português (Brasil)**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>>. Acesso em: 8 set. 2021.

AKUTSE, K. S. et al. Ovicidal effects of entomopathogenic fungal isolates on the invasive Fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 143, n. 6, p. 626–634, 2019.

ALVES, R. T.; FARIA, M. Pequeno Manual Sobre Fungos Entomopatogênicos. **Embrapa Cerrados**, p. 47, 2010.

AMATUZZI, R. F. et al. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to soil-borne entomopathogenic fungi. **Insects**, v. 9, n. 2, 2018a.

AMATUZZI, R. F. et al. Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera:Crambidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 3, p. 429–435, 2018b.

ANEJA, K. R.; KHAN, S. A.; ANEJA, A. Biopesticides an eco-friendly pest management approach in agriculture: status and prospects. **Kavaka**, v. 154, p. 145–154, 2016.

ANTUNES, L. E. C.; BONOW, S.; JUNIOR, R. Morango crescimento constante em área e produção. **Embrapa Clima Temperado (CPACT)**, v. 37, n. 2316–6304, p. 88–92, 2020.

ANTUNES, L. E. C. et al. Morango produção aumenta ano a ano. **Anuário HF Campo e Negócio**, n. 2013, p. 1–4, 2021.

ANTUNES, L. E. C.; JÚNIOR, C. R.; SCHWENGBER, J. E. **Morangueiro**. 1. ed, 2016.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA Plano Plurianual 2017-2020 – Ciclo 2017/2018**, p. ABNT, 2019.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/registro-de-produtos-biologicos>>. Acesso em: 10 set. 2022.

ARA, Z. G.; HAQUE, A. R. A Comprehensive Review on Synthetic Insecticides: Toxicity to Pollinators, Associated Risk to Food Security, and Management Approaches. **Journal of Biosystems Engineering**, v. 46, n. 3, p. 254–272,

2021.

ARAÚJO, W. L. et al. Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. **CALQ**, 2002.

ARAÚJO, E. S. et al. Compatibility between entomopathogenic fungi and egg parasitoids (Trichogrammatidae): A laboratory study for their combined use to control *Duponchelia fovealis*. **Insects**, v. 11, n. 9, p. 1–14, 2020.

AYDIN, T. et al. Significant mortality of eggs and young larvae of two pine processionary moth species due to the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 4, p. 317–331, 2018.

BACCI, L. et al. Toxicity of insecticides to the sweetpotato whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) and its natural enemies. **Pest Management Science**, v. 63, n. 7, p. 699–706, jul. 2007.

BAJA, F. et al. Infection of *Beauveria bassiana* and *Cordyceps javanica* on different immature stages of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). **Crop Protection**, v. 138, n. June, 2020.

BARRATT, B. I. P.; MORAN, V. C.; BIGLER, F.; LENTEREN, J. C. V. The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. **BioControl**, v. 63, p. 155–167, 2017.

BELTRÃO, H. D. B. M. **Interação das toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* com o mesêntero de larvas do vetor *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. 96 f. Dissertação (Mestrado em saúde pública) – Departamento de Entomologia, Fiocruz, Recife, 2006.

BERNARDI, D.; BOTTON, M.; NAVA, D.; ZAWADNEAK, M. A. C. Guia para a identificação e monitoramento de pragas e seus inimigos naturais em morangueiro. **Embrapa**, 2015.

BETHKE, J. A.; VANDER MEY, B. Pest Alert *Duponchelia fovealis*. **University of California Cooperative Extension San Diego**, n. June, p. 2–3, 2010.

BOBROWSKI, V. L. et al. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas *Bacillus thuringiensis* genes: an approach to confer insect resistance to plants. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 843–850, 2003.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 1, p. 10–15, 2012.

BRAMBILA, J.; STOCKS, I. The European pepper moth, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a Mediterranean pest moth discovered in central Florida. **Pest Alert DACS-P-01752, Florida Dept. of Agric. and Consumer Services, Div. Plant Industry**, n. December 2016, p. 1–4, 2010.

BRASIL. LEI Nº 7.802, DE 11 DE JULHO DE 1989. Regulamento. p. 1–7, 1989.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA CONJUNTA Nº 03, de 10 de Março de 2006 O. p. 5–65, 2006.

BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423–431, 2011.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423–435, 2007.

BRITAIN, C.; POTTS, S. G. The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. **Basic and applied ecology**, 2010.

CABI. *Duponchelia fovealis* (Southern European marshland pyralid). Disponível em: <<https://www.cabi.org/isc/datasheet/20168>>. Acesso em: 2 fev. 2022.

CAMPBELL, B. E.; PEREIRA, R. M.; KOEHLER, P. G. Complications with Controlling Insect Eggs. **Insecticides Resistance**, v. 32, p. 137–144, 2016.

CASTRO, B. et al. Toxicity and cytopathology mediated by *Bacillus thuringiensis* in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Scientific Reports**, v. 9, n. 6667, 2019.

CHARNLEY, A. K. Fungal Pathogens of Insects : Cuticle Degrading Enzymes and Toxins. **Botanical research**, v. 40, 2003.

CHOWAŃSKI, S. et al. Synthetic insecticides - Is there an alternative?. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 23, n. 2, p. 291–302, 2014.

COLMENAREZ, Y. C. **Virulência de *Thyrinteina arnobia* virus (TaV) e de *Bacillus thuringiensis* à *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae): efeito da temperatura no desenvolvimento das lagartas e do pH da calda de pulverização**. 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Ciências Agrônomicas da UNESP, Botucatu, 2003.

CORREA, R. F. T. **Avaliação da toxicidade de proteínas Cry e Cyt de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* para diferentes linhagens de células de inseto e de mamífero**. 127 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Departamento de Biologia celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

CRUZ-ESTEBAN, S.; ROJAS, J. C. Pheromone-Baited Traps Confirm the Presence of *Duponchelia fovealis* in Strawberry Crops in Mexico. **Southwestern Entomologist**, v. 46, n. 2, p. 533–536, 2021.

DALZOTO, P. R.; UHRY, K. F. Controle biológico de pragas no Brasil por meio de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill 37. **Biológico**, v. 71, n. 1, p. 37–41, 2009.

DAMALAS, C. A.; KOUTROUBAS, S. D. Current Status and Recent Developments in Biopesticide Use. **Agriculture**, v. 8, n. 13, 2018.

DARA, S. K.; PECK, D.; MURRAY, D. Chemical and non-chemical options for managing twospotted spider mite, western tarnished plant bug and other arthropod pests in strawberries. **Insects** v. 9, n. 10, 2018.

DE LA CRUZ QUIROZ, R. et al. Fungi-based biopesticides: shelf-life preservation technologies used in commercial products. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 3, p. 1003–1015, 2019.

DE SILVA, N. I. et al. Use of endophytes as biocontrol agents. **Fungal Biology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 133–148, 2019.

DE SOUZA, M. T.; DE SOUZA, M. T.; ZAWADNEAK, M. A. C. Biology and life table parameters of the *Heliothrips haemorrhoidalis* on strawberries. **Phytoparasitica**, v. 50, n. 1, p. 35–41, 2021.

E. BIRCH, A. N.; BEGG, G. S.; SQUIRE, G. R. How agro-ecological research helps to address food security issues under new IPM and pesticide reduction policies for global crop production systems. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 10, p. 3251–3261, 2011.

EL SHAFEI, W. K. M.; MAHMOUD, R. H.; MOHAMED, S. S. Efficacy of some entomopathogens against *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) in stored date fruits. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 32, n. 45, p. 7, 2022.

EMBRAPA Meio Ambiente – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnicas/-/produto-servico/6121/producao-integrada-de-morango>>. Acesso em: 16 set. 2022.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/countryprofiles/index/en/?iso3=BRA>>. Acesso em: 02 jul. 2022.

FERNÁNDEZ-CHAPA, D.; RAMÍREZ-VILLALOBOS, J.; GALÁN-WONG, L. Toxic Potential of *Bacillus thuringiensis*: An Overview . **Protecting Rice Grains in the Post-Genomic Era**, p. 1–22, 2019.

FILOMENO, C. A. et al. *Corymbia* spp. and *Eucalyptus* spp. essential oils have insecticidal activity against *Plutella xylostella*. **Industrial Crops and Products**, v. 109, n. August, p. 374–383, 2017.

FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. Controle biológico de pragas agrícolas. **Embrapa**, v. 148, 2020.

FURUIE, J. L. et al. Isolation of *Beauveria* Strains and Their Potential as Control Agents for *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae). **Insects**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2022.

GARRIDO-JURADO, I. et al. Soil drenching with entomopathogenic fungi for control of the soil-dwelling life stages and adults of the same generation of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of**

Entomological Research, v. 110, n. 2, p. 242–248, 2020.

GILL, S. Another Invasive Species in Maryland: The European Pepper Moth. 2013.

GODONOU, I. et al. Potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates from Benin to control *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). **Crop Protection**, v. 28, n. 3, p. 220–224, 2009.

GOETTEL, M. S. et al. Safety of fungal biocontrol agents. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. **Safety of Fungal Biocontrol Agents**, n. 2000, p. 347–375, 2001.

GONZALEZ, F. et al. New opportunities for the integration of microorganisms into biological pest control systems in greenhouse crops. **Journal of Pest Science**, v. 89, n. 2, p. 295–311, 2016.

GRAHAM, J. *Fragaria* Strawberry. **Biotechnology in agriculture series**, p. 456–474, 2005.

GUIMARÃES, J. A.; FILHO, M. M.; RIBEIRO, M. G. P. M.; JUNQUEIRA, A. M. R.; LIZ, R. S. Descrição e manejo das principais pragas do morangueiro. **Embrapa Hortaliças**. 1. ed, 2010.

HUSSAIN, A. et al. Entomopathogenic fungi disturbed the larval growth and feeding performance of *Ocinara varians* (Lepidoptera: Bombycidae) larvae. **Insect Science**, v. 16, p. 511–517, 2009.

IBAMA. PORTARIA NORMATIVA Nº 131, DE 3 DE NOVEMBRO DE 1997. p. 3–5, 1997.

INGLIS, G. D. et al. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**, n. 1993, p. 23–69, 2012.

ISLAM, W. et al. Insect-fungal-interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests. **Microbial Pathogenesis**, v. 159, n. March, p. 105122, 2021.

ITO, F. A. D.; PIMENTEL, I. C.; POINTEVIN, C. G. Niger seed agar as an inductor of sporulation of filamentous fungi with potential in biological control of agricultural diseases and pests. **International Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 3, p. 1509–1513, 2019.

JIANG, H.; VILCINSKAS, A.; KANOST, M. R. Chapter 10 Immunity in Lepidopteran insects. **Invertebrate Immunity**, p. 181–204, 2010.

JOUZANI, G. S.; VALIJANIAN, E.; SHARAFI, R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidigs. **Microbial Biotechnol**, v. 101, p. 2691–2711, 2017.

KAISER, D.; BACHER, S.; MENÉ-SAFFRANÉ, L.; GRABENWEGER, G.

Efficiency of natural substances to protect *Beauveria bassiana* conidia from UV radiation. **Pest Management Science**, 2018.

KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. **Journal of the American Statistical Association**, v. 53, n. 282, p. 457–481, 1958.

KNAAK, N.; FIUZA, L. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120–132, 2010.

KUMAR, S.; SINGH, A. Biopesticides: Present Status and the Future Prospects. **Journal of Fertilizers & Pesticides**, v. 06, n. 02, 2015.

LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1–41, 2015.

LACEY, L. A.; SIEGEL, J. P. Safety and ecotoxicology of entomopathogenic bacteria. **Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application**, p. 253–273, 2000.

LACEY, L. A.; MERRITT, R. W. The safety of bacterial microbial agents used for black fly and mosquito. **Environmental Impacts of Microbial Insecticides**, p. 151–168, 2003.

LIAO, C. et al. Binding of Cry δ -endotoxins to brush border membrane vesicles of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Science**, v. 12, n. 4, p. 231–240, 2005.

LIMA, G. M. S. Proteínas bioinseticidas produzidas por *Bacillus thuringiensis*. **Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 7, p. 119–137, 2010.

LIMA, M. A. Qualidade de morango quanto à segurança. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 0, n. 0, p. 50–54, 2015.

LOEB, M. J. et al. Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 6, p. 599–606, 2001.

LOHSE, R. et al. Evaluation of new fermentation and formulation strategies for a high endophytic establishment of *Beauveria bassiana* in oilseed rape plants. **Biological Control**, v. 88, p. 26–36, 2015.

MACHADO, J. Strawberry cultivation in Brazil. **Revista Geama**, v. 2, n. 3, p. 230–238, 2016.

MAHBUBUR RAHMAN, M.; ROBERTS, H. L. S.; SCHMIDT, O. Tolerance to *Bacillus thuringiensis* endotoxin in immune-suppressed larvae of the flour moth *Ephesia kuehniella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, n. 2, p. 125–132, 2007.

MAPA. **MAPA** **Indicadores.** Disponível em:

<<https://indicadores.agricultura.gov.br/agrofit/index.htm>>. Acesso em: 28 jun. 2022.

MASCARIN, G. M. et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 165, n. December 2017, p. 46–53, 2019.

MATYJASZCZYK, E. Products containing microorganisms as a tool in integrated pest management and the rules of their market placement in the European Union. **Pest Management Science**, v. 71, n. 9, p. 1201–1206, 2015.

MELATTI, V. M. **Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*)**. 120 f. Projeto de Dissertação (Mestrado em Ciências agrárias) – Agronomia e medicina veterinária, Universidade de Brasília, Brasília/DF, 2008.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. **Mycological Research**, v. 110, n. 2, p. 188–195, 2006a.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 113, n. 1–4, p. 336–341, 2006b.

MIDINGOYI, S. G. et al. Do farmers and the Environment Benefit from Adopting Integrated Pest Management Practices? Evidence from Kenya. **Journal of Agricultural Economics**. 2018.

MOHAMMADBEIGI, A.; PORT, G. Effect of infection by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the feeding of *Uvarovistia zebra*. **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 4–7, 2015.

MOLNÁR, P. B. et al. Identification of the Female-Produced Sex Pheromone of an Invasive Greenhouse Pest, the European Pepper Moth (*Duponchelia fovealis*). **Journal of Chemical Ecology**, v. 44, n. 3, p. 257–267, 2018.

MONNERAT, R. et al. Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* cry toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7029–7035, 2006.

MONNERAT, R. et al. Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* para uso na agricultura. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p. 34, 2018.

MONNERAT, R. et al. Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. **Documentos Embrapa**, v. 369, p. 46, 2020.

MOONJELY, S.; BARELLI, L.; BIDOCHKA, M. J. Insect Pathogenic Fungi as Endophytes. **Advances in Genetics**, v. 94, p. 107–135, 2016.

MURPHY, G. **An overview of *Duponchelia* control options - Greenhouse Canada**. Disponível em: <<https://www.greenhousecanada.com/an-overview-of-duponchelia-control-options-1424/>>. Acesso em: 22 abr. 2022.

NUSSENBAUM, A. L.; LECUONA, R. E. Selection of *Beauveria bassiana* sensu lato and *Metarhizium anisopliae* sensu lato isolates as microbial control agents against the boll weevil (*Anthonomus grandis*) in Argentina. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 1, p. 1–7, 2012.

O'CALLAGHAN, M.; BROWNBRIDGE, M. Use of Microbes for Control and Eradication of Invasive Arthropods. **Springer**, v. 6, 2009.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. Avaliação da Periculosidade Ambiental de Bioinseticidas como uma Nova Perspectiva para a Ecotoxicologia no Brasil. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2008.

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.

OLIVEIRA, D. G. P. et al. Increased tolerance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* conidia to high temperature provided by oil-based formulations. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 151, n. February 2017, p. 151–157, 2018.

OPISA, S. et al. Effects of Entomopathogenic fungi and *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides on *Spoladea recurvalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 142, n. 6, p. 617–626, 2018.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 46–70, 2012.

PAES, J. P. P. et al. Thermal requirements, development and number of generations of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 2447–2457, 2018.

PAIVA, K. D. et al. *Ascophyllum Nodosum* seaweed extract as an alternative for control of post-harvest soft rot in strawberries. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 13532–13543, 2020.

PALMA, L. et al. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An overview of their biocidal activity, 2014.

PARA/PR. RELATÓRIO PARA/PR Resultado do Ciclo 2018-2019. 2020.

PARK, S. E. et al. Solid cultures of thrips-pathogenic fungi *Isaria javanica* strains for enhanced conidial productivity and thermotolerance. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 21, n. 4, p. 1102–1109, 2018.

PARRA, J. R. P. Biological control in Brazil: An overview. **Scientia Agricola**, v.

71, n. 5, p. 420–429, 2014.

PARRA, J. R. T. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. **Piracicaba: ESALQ/FEALQ**, 2001.

PETRUCCI, K. P. O. S. et al. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae). **Nucleus**, v. 17, n. 1, p. 293–304, 2020.

PIROVANI, V. D. et al. Manejo de Pragas para Cultura do Morangueiro : Sem Resíduo de Agrotóxicos. v. 1847, n. August, p. 64, 2015.

PIROVANI, V. D. **Métodos de manejo para *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) na cultura do morangueiro**. 113 f. Tese (Doutorado em Produção vegetal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2016.

PLATA-RUEDA, A. et al. Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains on the Nettle Caterpillar, *Euprosterina elaeasa* (Lepdoptera: Limacodidae). **Insects**, v. 11, n. 310, 2020.

POITEVIN, C. G. et al. Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 53, n. 3, p. 323–331, 2018.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma Breve Revisão. **Agrociencia**, v. 7, n. 2, p. 1–10, 2003.

PROCOPIUK, M. **Desempenho de dois cultivares de morangueiro em sistema orgânico sob dois tipos de túneis**. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

PUTNOKY-CSICSÓ, B. et al. Entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (strain NCAIM 362) effects on soil inhabiting *Melolontha melolontha* (Coleoptera) and *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera) larvae in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). **Plant Protection Science**, v. 58, n. 3, p. 264–268, 2022.

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.

RANGEL, D. E. N. et al. Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 383–404, 2015.

REGODE, V. et al. Isolation and characterization of gut bacterial proteases involved in inducing pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* toxin in Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. OCT, p. 1–11, 2016.

RIBEIRO, M. C. et al. Avaliação e monitoramento dos níveis de contaminação

por resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal comercializados no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e44610212802, 2021.

ROBERTSON, J. L. et al. Bioassays with Arthropods. v. 05, p. 1997–1999, 2008.

ROBLES-ACOSTA, I. N. et al. Entomopathogenic Fungi as Biological Control Agents of *Phyllocoptruta oleivora* (Prostigmata: Eriophyidae) under Greenhouse Conditions. **Florida Entomologist**, v. 102, n. 2, p. 303–308, 2019.

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

RODRIGUES, P. R. **Potencial de fungos entomopatogênicos comerciais para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)**. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos 2019.

ROHLFS, M.; CHURCHILL, A. C. L. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 1, p. 23–34, 2011.

ROJAS, V. M. A. **Caracterização do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* quanto à produção de conídios, efeitos da radiação ultravioleta-B, temperatura alta e persistência em formulações do tipo dispersão oleosa**. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

RONDELLI, V. M. et al. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* potenciais para o controle da traça-das-crucíferas. **Horticultura brasileira**, v. 30, n. 1, p. 391–396, 2012.

SAMADA, L. H.; TAMBUNAN, U. S. F. Biopesticides as promising alternatives to chemical pesticides: A review of their current and future status. **OnLine Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 2, p. 66–76, 2020.

SANTOS, F. M. et al. Toxicity of Insecticides in *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a New Strawberry Pest in Brazil under Laboratory Conditions. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 39, n. 5, p. 1–7, 2019.

SCHALL, R. *Duponchelia fovealis* Zeller: *Duponchelia*. **UF/IFAS Pest Alert.**, n. 919, p. 7, 2005.

SCHEMMER, R. et al. Natural Prevalence of Entomopathogenic Fungi in Hibernating Pupae of *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae) and Virulence of Selected Isolates. **Plant Protect. Sci.**, v. 52, p. 199–208, 2016.

SEAB. **Secretaria da Agricultura e do Abastecimento**. Disponível em: <<https://www.agricultura.pr.gov.br/>>. Acesso em: 8 set. 2021.

SHARMA, R.; SHARMA, P. **Fungal entomopathogens review**, 2021.

SILVA, H. **Mechanism of action of Cry1Ac toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae)**. 117 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Departamento de agricultura e ciências veterinária, Jaboticaba, 2021.

SILVA, G. A. et al. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **Pest Management Science**, v. 67, n. 8, p. 913–920, 2011.

SILVA, K. F. D. et al. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Field Populations to the Cry1F *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Protein. **Florida Entomologist**, v. 99, n. 4, p. 629–633, 2016.

SILVA, L. K. F.; CARVALHO, A. G. Patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1909) em lagartas de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera, hesperiidae). **Instituto de biologia**, v. 71, n. 2, p. 249–252, 2004.

SOUZA, J. C. et al. Ocorrência de nova praga nas lavouras de morango no Sul de Minas. **EPAMIG. Circular Técnica**, n.180, n. 31, p. 5, 2013.

SRYGLEY, R. B. Ontogenetic changes in immunity and susceptibility to fungal infection in Mormon crickets *Anabrus simplex*. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 3, p. 342–347, 2012.

STENBERG, J. A. A Conceptual Framework for Integrated Pest Management. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 9, p. 759–769, 2017.

STOCKS, S. D.; HODGES, A. European Pepper Moth or Southern European Marsh Pyralid *Duponchelia fovealis* (Zeller). **Department of Entomology and Nematology; UF/IFAS Extension, Gainesville, FL 32611. Document EENY-508**, p. 10, 2013.

STUART, A. K. C.; FURUIE, J. L.; CATALDI, T. R.; STUART, R. M.; ZAWADNEAK, M. A. C.; LABATE, C. A.; PIMENTEL, I. C. Fungal consortium of two *Beauveria bassiana* strains increases their virulence, growth, and resistance to stress: A metabolomic approach. **Plos One**, v. 17, p. 17, 2022.

TORDIN, C. Produção integrada de morango agrega valor à fruta. **Revista cultivar**, Rio grande do Sul, 04 junho 2019. Disponível em: <<https://revistacultivar.com.br/noticias/producao-integrada-de-morango-agrega-valor-a-fruta>>. Acesso em: 16 set. 2022.

THOMAZONI, D.; FORMENTINI, M. A.; ALVES, L. F. A. Patogenicidade de isolados de fungos entomopatogênicos à *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 2, p. 126–133, 2014.

TRAUGOTT, M.; WEISSTEINER, S.; STRASSER, H. Effects of the

entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii* on the non-target predator *Poecilus versicolor* (Coleoptera: Carabidae). **Biological Control**, v. 33, n. 1, p. 107–112, 2005.

VEGA, F. E. et al. Dissemination of Beneficial Microbial Agents by Insects. **Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**, p. 153–177, 2007.

VEGRO, C. L. R.; GONÇALVES, J. S.; LEME, P. H. C. Café para o capital. p. 1–2, 2012.

VIANA, C. L. T. et al. Efeito de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner em *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) Effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner new strains against *Plutella xylostella*. **Biologia**, n. January, p. 22–31, 2009.

VINCENT, J. F. V.; WEGST, U. G. K. Design and mechanical properties of insect cuticle. **Arthropod Structure and Development**, v. 33, n. 3, p. 187–199, 2004.

VINEELA, V. et al. Enhanced bioefficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) through particle size reduction and formulation as a suspension concentrate. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 58–69, 2017.

WANG, J.; LOVETT, B.; ST. LEGER, R. J. The secretome and chemistry of *Metarhizium*; a genus of entomopathogenic fungi. **Fungal Ecology**, v. 38, p. 7–11, 2019.

WITZGALL, P.; KIRSCH, P.; CORK, A. Sex pheromones and their impact on pest management. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 1, p. 80–100, 2010.

XIONG, Q. et al. Morphological and ultrastructural characterization of *Carposina sasakii* larvae (Lepidoptera: Carposinidae) infected by *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales: Clavicipitaceae). **Micron**, v. 44, n. 1, p. 303–311, 2013.

ZAKI, O. et al. Limiting factors of mycopesticide development. **Biological Control**, v. 144, n. 2, p. 104220, 2020.

ZAWADNEAK, M. A. C.; ROSADO NETO, G. H.; SCHUBER, J. M.; PARCHEN, H. A. First Record of *Spintherophyta semiaurata* (Klug) (Coleoptera: Chrysomelidae) Damaging Strawberry Flowers. **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 3, p. 407–408, 2011.

ZAWADNEAK, M. A. C.; GONÇALVES, R. B.; BISCHOFF, A. *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae): nova praga no Brasil. **Universidade Federal do Paraná**, p. 19, 2014.

ZAWADNEAK, M. A. C. et al. First record of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia (Chile)**, v. 34, n. 3, p. 91–95, 2016.

ZAWADNEAK, M. A. C. et al. Biological parameters of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) reared in the laboratory on two diets. **European**

Journal of Entomology, v. 114, n. 3, p. 291–294, 2017.

ZAWADNEAK, M. A. C.; REINHARDT, V.; ROSA, J. M.; DE SOUZA, M. T.; DE SOUZA, M. T. Manejo integrado de pragas do morangueiro. **Senar AR/PR**, v. 01, p. 74, 2020.

ZEIST. Strawberry breeding in Brazil: current momentum and perspectives. **Horticultura brasileira**, p. 7–16, 2019.

ZHANG, L.; SHI, W. B.; FENG, M. G. Histopathological and molecular insights into the ovicidal activities of two entomopathogenic fungi against two-spotted spider mite. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 117, n. 1, p. 73–78, 2014.

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

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): Biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 9, p. 865–901, 2008.