



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HORTICULTURA  
TROPICAL**

**JESSÉ MALVEIRA GOMES**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA LINHAGEM  
BACTERIANA 358.1 SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E.  
SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

**Pombal - PB**

**2017**

**JESSÉ MALVEIRA GOMES**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA LINHAGEM  
BACTERIANA 358.1 SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E.  
SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Horticultura Tropical, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Sekiguchi de Godoy.

**Pombal - PB**

**2017**

**JESSÉ MALVEIRA GOMES**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA LINHAGEM  
BACTERIANA 358.1 SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E.  
SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Horticultura Tropical, para obtenção do título de mestre.

Aprovada em: \_\_\_ de março de 2017.

---

Prof.: Dr. Maurício Sekiguchi de Godoy  
UFERSA/CCTA  
Orientador

---

Prof.: Dra. Raphaela Vasconcelos Gomes Barreto  
UFERSA/CCBS  
Examinadora

---

Prof.: Dra. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio  
UFERSA/CCTA  
Examinadora

*A Deus, que me proveu forças para continuar batalhando na vida, a meus pais, irmão e familiares que sempre me apoiaram nos momentos mais difíceis de minha vida e a todos meus entes queridos, amigos e professores que sempre estiveram do meu lado...*

*DEDICO*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que sempre esteve ao meu lado nos momentos difíceis e me proporcionou seguranças em minhas viagens na estrada para que eu chegasse em paz em casa.

Aos meus pais, Wellington Gomes e Jecimar Malveira, um casal muito responsável que fez tudo por mim sempre que necessário. Por trabalharem tanto para que eu pudesse viver em outra cidade para que eu pudesse cursar a Pós-Graduação, dando muito apoio como sempre em meus estudos.

Ao meu irmão que, com quem sempre tive um senso maior de responsabilidade e, com isso, sempre tive a obrigação comigo mesmo de ser um bom exemplo para ele, e um melhor estudante e profissional em minha área. Por todo apoio moral que ele me deu.

Ao meu amigo, mentor e orientador Prof. Dr. Maurício Sekiguchi de Godoy, que me promoveu essa grande oportunidade de trabalhar com ele e aprender ainda mais em um Mestrado, sempre me apoiando e acreditando em mim, por ser um grande ouvinte e conselheiro nos momentos difíceis.

À minha co-orientadora, Prof.<sup>a</sup>. Dra. Raphaela Vasconcelos Gomes Barreto, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela confiança que sempre depositou em mim. Por todas as reclamações e dicas que proporcionaram meu crescimento pessoal e profissional.

A todos os meus amigos do laboratório, Louise Helena, Sara, Camila, Auricélia, Galdino, Alfredo, Valeria, Luciano, Paulo, Bárbara e Valesca que desde o começo me receberam de braços abertos e sem hesitar, compartilharam comigo todo seu carinho e amizade. Me ajudaram demais nos experimentos realizados.

A Bárbara, que nesta última etapa do Mestrado me ajudou bastante, com as análises estatísticas para dissertação.

A meu amigo de Ramon Cavalcante pela ajuda com a construção do Abstract desse trabalho.

A meus amigos Guerreiro e Alisson que me ajudaram conseguindo sementes de milho e inseticidas químicos para os experimentos.

A Prof.<sup>a</sup> Selma, que sempre disponibilizou seu laboratório e proveu equipamentos para que pudesse dar continuidade em meus experimentos.

A Prof.<sup>a</sup> Jailma, que disponibilizou seu espaço na estufa e ferramentas necessárias para o plantio de milho nos vasos utilizados nos experimentos.

Ao Prof. Taffarel e Prof<sup>a</sup> Michele Dalvina, que disponibilizou seu laboratório e equipamentos sempre que eu necessitei em meus experimentos.

A toda minha família e amigos de Limoeiro do Norte que sempre estiveram comigo.

A Prof. Dra. Raphaela Vasconcelos Gomes Barreto e Prof. Dra. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio por aceitarem o convite para participarem da minha banca avaliadora.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não  
sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não  
sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

## RESUMO

GOMES, Jessé Malveira. **Avaliação toxicológica da linhagem bacteriana 358.1 isolada do petróleo sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**, 2017. 62p. Dissertação (Mestrado em Horticultura Tropical) - Universidade Federal de Campina Grande, Pombal - PB<sup>1</sup>.

O milho é uma das culturas mais produzida e importante no mundo, sendo utilizada na alimentação humana e animal. O Brasil é um dos maiores produtores desse grão, sendo o terceiro maior produtor do mundo. Apesar de uma produção elevada, a produtividade é comprometida pela ação de insetos pragas, sendo a *Spodoptera frugiperda* Smith a de maior atuação nessa cultura. Em meio a esse desafio, o uso constante de inseticidas é utilizado com intuito de minimizar as perdas nas lavouras, porém, ocasionando grandes impactos ambientais, bem como a contaminação de trabalhadores rurais. Uma das estratégias viáveis e promissoras na supressão de pragas tem sido o manejo integrado de pragas (MIP), que tem como alicerce o uso isolado ou consorciado de técnicas de controles de pragas, sendo o controle biológico uma das ferramentas mais sustentáveis do ponto de vista ecológico. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade da cepa bacteriana 358.1 isolada do petróleo e o sobrenadante da cultura de células sobre o controle de lagartas de 2º e 3º instares de *S. frugiperda*, comparando as taxas de mortalidade e efeitos sobre seu desenvolvimento e com inseticidas químicos comerciais. O experimento consistiu de duas etapas, o primeiro ensaio foi realizado com lagartas de 3º instar com três diluições diferentes da cepa 358.1, sobrenadante da cultura de células, solução salina como controle negativo e o inseticida fenpropatrina como controle positivo. No segundo ensaio utilizou-se lagartas de 3º e 2º instares, a cultura celular da cepa 358.1 em sua concentração total ( $4 \times 10^8$  UFC/mL), seu sobrenadante da cultura, como controle negativo água destilada e testemunha positiva o produto comercial flubendiamida. Os experimentos com a cepa 358.1, sobrenadante da cultura de células e os produtos químicos testados não resultaram em uma taxa de mortalidade de *S. frugiperda* significativa, porém, a cepa 358.1 e seu sobrenadante da cultura resultaram no aumento da duração da fase larval e em distúrbios morfofisiológicos do inseto, ocasionando, inclusive, no surgimento de adultos com asas atrofiadas, sendo desta maneira, promissores para à realização de novos testes.

Palavras-chave: *Bacillus* sp., lagarta do cartucho, MIP, controle biológico.

<sup>1</sup>Orientador: Prof.: Dr. Maurício Sekiguchi de Godoy, UFERSA /CCTA

## ABSTRACT

**GOMES, Jessé Malveira. Toxicologic evaluation of the 358.1 bacterium strain isolated from the oil on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), 2017. 62p. Thesis (Tropical Horticulture Mastering) – Federal University of Campina Grande, Pombal - PB<sup>1</sup>.**

Corn is one of the most produced and important crops in the world, utilized for human and animal feeding. Brazil is one of the top producers of this grain, being the third biggest producer worldwide. Despite the great production, the productivity is compromised due to the activity of insect pest. Because of this challenge, the continuous use of insecticides is done aiming to minimize lost in the crops. However, it causes major environmental impact and it is also contaminating rural workers. One of the viable and promising strategies to the pest suppression has been the pest integrated management (PIM), which is based on the use of isolated or consortium of pest controlling techniques, the biological control being one of the most sustainable tools in an ecological perspective. Therefore, the present study had the goal of evaluating the toxicity of the 358.1 bacterium strain isolated from the oil and supernatant of the cell culture under control of caterpillars from 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> instars of *S. frugiperda*, comparing the death rates and effects on their development, and also comparing with commercial chemical insecticides. The experiment consisted in two stages; the first assay was done with 3<sup>rd</sup> instar caterpillar with three different dilutions from the 358.1 strain, supernatant of the cell culture, saline solution as negative control, and fenpropratrina insecticide as positive control. On the second assay, 3<sup>rd</sup> and 2<sup>nd</sup> instars caterpillars were used, the cell culture from the 358.1 strain on its total concentration ( $4 \times 10^8$  UFC/mL), supernatant of the cell culture, distilled water as negative control and flubendiamida, a commercialized product, as the positive control. The experiments with the 358.1 strain, supernatant of the cell culture and the tested chemical products didn't show a significant death rate for *S. frugiperda*, however, the 358.1 strain and supernatant of the cell culture resulted in an increase in the larval phase duration and on morphophysiological disturbs on the insect, resulting yet in the emergence of adults with atrophied wings, thus being promising to the realization of new tests.

Keywords: *Bacillus* sp., Cartridge crank, PIM, biological control.

<sup>1</sup>Orientador: Prof.: Dr. Maurício Sekiguchi de Godoy, UFERSA /CCTA

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Adultos (Fêmea e Macho) de *S. frugiperda* após a emergência.....26
- Figura 2. Criação de *S. frugiperda* coletadas em campo (A), Lagartas alimentadas com folhas de milho, início do estágio de pupa (B) e Fase de pupa em laboratório (C).....26
- Figura 3. Confeção da gaiola de criação (A), Solução de mel a 10% para alimentação dos adultos (B) e Gaiola com adultos de *S. frugiperda* (C).....27
- Figura 4. Característica morfológica da linhagem 358.1 em lâmina corada pelo método de Gram e fotografada em microscópio óptico com aumento de 1000 x (GOMES, 2014).....29
- Figura 5. Lagartas de *S. frugiperda* no 3º instar (A), Exúvia liberada após a troca de tegumento (B), Muda (C).....31
- Figura 6. Crescimento da cepa 358.1 em diferentes pHs testados.....36
- Figura 7. Fermentação em Erlenmeyers de 250 mL (A), Centrifugação do caldo e obtenção do sobrenadante (B), Teste do espalhamento do óleo, produção de biossurfactante (C).....37
- Figura 8. Curva de mortalidade acumulada de lagartas do 3º ao 6º instar ao longo do tempo. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 0,05. Fenpropratrina (+) e Solução salina (-).....38
- Figura 9. Danos morfológicos nas asas de adultos recém emergidos de *S. frugiperda* quando lagartas de 3º instar foram contaminadas com o sobrenadante da cultura (A) ou Cultura de células da cepa 358.1 diluída a 50% (B).....43
- Figura 10. Curva de mortalidade acumulada de lagartas de 2º-6º instar, quando lagartas de 2º instar foram contaminadas com áreas foliares contendo os tratamentos. Flubendiamida (+) e água destilada (-).....48
- Figura 11. Deformidade morfológicas nas asas de adultos de *S. frugiperda*, Controle negativo (A) e Sobrenadante da cultura (B) e Cultura de células da cepa 358.1 na concentração total (C) quando lagartas de 2º instares foram contaminadas.....51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MIP	Manejo Integrado de Pragas
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
$\mu$ L	Microlitro
mL	Mililitro
v/v	volume/volume
ha	Hectare
cm	Centímetro
g	Gramma
<i>g</i>	Força centrífuga relativa
Mm	Milímetro
Rpm	Rotações por minuto
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
CCTA	Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semiárido

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1. Importância econômica da cultura do milho</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2. Insetos praga da cultura do milho</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3. Taxonomia e biologia de <i>Spodoptera frugiperda</i></b> .....	<b>18</b>
<b>2.4. Importância econômica de <i>Spodoptera frugiperda</i> na cultura do milho</b> .....	<b>19</b>
<b>2.5. Manejo integrado de <i>Spodoptera frugiperda</i> na cultura do milho</b> .....	<b>21</b>
<b>2.6. Controle biológico de <i>Spodoptera frugiperda</i> na cultura do milho</b> .....	<b>22</b>
2.6.1. Microrganismos no controle biológico de <i>Spodoptera frugiperda</i> na cultura do milho	23
2.6.2. Bioinseticidas microbiano .....	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1. Criação de <i>Spodoptera frugiperda</i></b> .....	<b>26</b>
<b>3.2. Biologia de <i>Spodoptera frugiperda in vitro</i></b> .....	<b>29</b>
<b>3.3. Cultivo bacteriano e fermentação</b> .....	<b>29</b>
<b>3.4. Toxicidade da cepa bacteriana 358.1 sobre lagartas de 3º instar de <i>S. frugiperda</i> em arenas foliares não esterilizadas</b> .....	<b>31</b>
<b>3.5. Toxicidade da cepa bacteriana 358.1 sobre lagartas de 3º instar de <i>S. frugiperda</i> em arenas foliares esterilizadas</b> .....	<b>33</b>
<b>3.6. Toxicidade da cepa bacteriana 358.1 sobre lagartas de 2º instar de <i>S. frugiperda</i> em arenas foliares esterilizadas</b> .....	<b>34</b>
<b>3.7. Análises estatísticas</b> .....	<b>34</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1. Parâmetros biológicos de <i>Spodoptera frugiperda</i> obtidos em condições <i>in vitro</i></b> .....	<b>35</b>
<b>4.2. Cultivo bacteriano em diferentes pHs e fermentação para produção de biossurfactante</b> .....	<b>37</b>
4.2.1. Avaliação da cepa 358.1 sobre lagartas de 3º instar <i>S. frugiperda</i> .....	38
4.2.1.1. Toxicidade de cepa bacteriana 358.1 sobre lagartas de 3º instar de <i>S. frugiperda</i> em arenas foliares não esterilizadas .....	38

4.2.1.2. Toxicidade de cepa bacteriana 358.1 sobre arenas foliares previamente esterilizadas e em seguida fornecidas a lagartas de 3º instar de <i>S. frugiperda</i> .....	45
4.2.2. Toxicidade de cepa bacteriana 358.1 sobre arenas foliares previamente esterilizadas e em seguida fornecidas a lagartas de 2º instar de <i>S. frugiperda</i> .....	48
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre as culturas mais produzidas no mundo, o milho é uma das mais importantes, tendo várias finalidades de uso, sendo principalmente para alimentação humana e animal, tais como bovinos, suínos e aves (ABIMILHO, 2014). É um produto cultivado tanto por produtores com grandes extensões de áreas como por pequenos proprietários (FERREIRA FILHO et al., 2010).

Considerando a importância econômica no mercado agrícola mundial, sua produção vem crescendo nos últimos anos. De acordo com a *United States Department of Agriculture* (USDA) (2014), os Estados Unidos da América (EUA) são o primeiro na produção desse grão, com o Brasil ocupando a terceira posição do *ranking*. Tal situação em que o Brasil se encontra é devido ao emprego de tecnologias que proporcionaram o aumento de produção de 140% e de áreas cultivadas de 11,7% nos últimos 20 anos, com destaque para o crescimento das regiões Norte (72%) e Nordeste (143%) em termos de produtividade (CONAB, 2014).

No entanto, a produtividade (quantidade/ área plantada), o Brasil está abaixo de alguns países. Sendo um dos fatores preponderante, a alta incidência de pragas, principalmente em virtude da presença da lagarta do cartucho do milho ou lagarta militar *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).

Mesmo com diversas estratégias de controle atuais, o controle químico predomina, com gasto anual superior a meio bilhão de dólares para suprimir esta praga e ainda de maneira pouco eficiente, com perdas variando de 275 milhões a 1,5 bilhões de dólares por ano (FERREIRA FILHO et al., 2010; CONAB, 2014).

Considerando as condições climáticas do Brasil, a *S. frugiperda* tem capacidade de infestar as safras do milho o ano inteiro, sua incidência tem aumentado devido ao desequilíbrio ecológico nos agroecossistemas proveniente da eliminação de seus inimigos naturais por consequência da crescente produção de milho no país, induzindo ao uso indiscriminado e demasiado de inseticidas. Dentre os sintomas de incidência da praga, as folhas raspadas são primeiramente perceptíveis e com o desenvolver das lagartas os danos vão ficando mais graves (CRUZ, 1995; CRUZ; MONTEIRO, 2004).

Em meio às estratégias de controle, o Manejo Integrado de pragas (MIP) com base no controle biológico, tem ganhado importância nas últimas décadas, uma vez que tais métodos buscam uma sustentabilidade e viabilidade ecológica no tratamento das pragas no agrossistema (WRIGHT, 2014).

Considerando que a lagarta-do-cartucho causa grandes perdas econômicas em culturas de grande importância, estudos sobre como combatê-la de maneira mais eficiente e ecologicamente viável têm sido intensificados, e, por conta disso, o controle biológico com a utilização de biopesticidas tem sido mais representativo, sendo uma alternativa muito promissora aos defensivos químicos.

Um dos mais difundidos inseticidas biológicos e de natureza microbiana é o *Bacillus thuringiensis*. Essa bactéria isolada do solo e Gram positiva tem capacidade de produzir endotoxinas que afetam severamente o sistema digestivo das lagartas levando-as à morte (COPPING; MENN, 2000). Foi relatado que bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* isoladas de solos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo, com capacidade de produzir metabólitos bioativos, denominados biossurfactantes com ação inseticida, larvicida e repelente contra mosquitos (PEREIRA et al., 2013; AYER, 2014).

Devido à crescente demanda por produtos alternativos para uma praga que causa grandes prejuízos econômicos à cultura do milho, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade da linhagem bacteriana 358.1 isolada do petróleo por Ferreira (2013) e do sobrenadante da cultura, no controle de lagartas de 2º e 3º instares de *S. frugiperda*, comparando as taxas de mortalidade e efeitos sobre seu desenvolvimento com intoxicação por inseticidas químicos comerciais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Importância econômica da cultura do milho

Como descreveram Cruz et al. (2009), o milho é uma planta da família Poacea e da espécie *Zea mays* L. De origem americana e amplamente cultivado em todo mundo, tem como principal finalidade a alimentação animal. Este é o principal macro ingrediente para a produção de rações. A cadeia produtiva do milho tem grande importância, devido a sua íntima ligação com os complexos produtores de carnes, sendo assim o principal insumo para produção de frango, suínos e pecuária leiteira (ABIMILHO, 2014). No Brasil a sua produção é de grande importância por dois motivos: o primeiro para pequenas propriedades rurais, com uma finalidade substancial; o segundo em grandes propriedades, que têm como objetivo o abastecimento do mercado externo e interno. Em virtude da sua alta qualidade nutricional, é utilizado na alimentação humana e animal (PAVÃO; FERREIRA FILHO, 2011).

No decorrer dos anos a sua importância vem aumentando de maneira exponencial, assim como sua produção. De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, na safra 2013/2014 sua produção mundial chegou a 980 milhões de toneladas. Os americanos são os primeiros na produção do grão, seguidos pela China e Brasil. Sendo o terceiro maior produtor mundial, o Brasil finalizou a colheita na safra de 2013 com quase 80 milhões de toneladas do grão e com um crescente aumento na safra 2014/2015, atingindo 84,7 milhões de toneladas de acordo com o quarto levantamento da CONAB em 2016 (USDA, 2014).

O grande aumento na produção brasileira levando-o da quarta posição para a terceira está relacionado ao aumento na utilização de tecnologia empregada para sua produção, permitindo, nos últimos 20 anos, aumento de 11,7% na área cultivada e de quase 141% na produção (CONAB, 2014).

A produtividade do milho se reflete no maior uso do plantio direto, correção e fertilização adequada do solo, fixação biológica de nitrogênio, manejo integrado de plantas invasoras e insetos pragas, bem como a adoção de sementes resistentes geneticamente modificadas (CRUZ, 2013).

Foram notáveis com o aumento do uso de tecnologias os grandes avanços da produção nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, com maior destaque ao Nordeste, que em décadas apresentou elevação na produtividade próxima a 143% da safra 2003/2004 a 2013/2014 (CONAB, 2014).

Apesar do avanço na produção do milho, o Brasil perde em produtividade quando comparado a outros países. Na safra 2013/2014, em média a produtividade Brasileira do grão foi de aproximadamente 4.176,00 Kg/ha (CONAB, 2014) perdendo para Argentina (7.000,00 Kg/ha), China (5.000,00 Kg/ha) e Estados Unidos (9.000,00 Kg/ha) (COSTA & COTA, 2009). Dentre os fatores responsáveis por essa baixa produtividade, as pragas são as que mais se destacam. De acordo com Viana; Cruz; Waquil (2006), o milho é atacado durante todo seu estágio fenológico, sendo a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a praga de maior importância na cultura do milho. Na soma, o custo econômico do controle de *S. frugiperda* é aproximadamente superior a 600 milhões de dólares por ano, além disso, mesmo com as medidas preventivas para controle desta praga existe uma oscilação na perda de produtividade de 2 a 10% o que implica num perda monetária anual de 274,4 milhões de dólares a 1,5 bilhões de dólares (FERREIRA FILHO et al., 2010).

## 2.2. Insetos praga da cultura do milho

Dentre as várias barreiras limitantes na cultura do milho para a obtenção de uma boa produção, existem os fatores bióticos e abióticos, sendo as pragas o fator biótico de maior relevância. Com isso o controle de pragas é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento e produção do milho, sendo preponderante no aumento do custo do grão tanto para o produtor como para o consumidor (ALMEIDA; BATISTA, 2001). No Brasil podemos apresentar três grupos de pragas da cultura do milho, de acordo com Cruz (1994), sendo as pragas iniciais e finais de ciclo, foliares e da espiga, respectivamente.

As pragas iniciais atacam sementes, raízes e plantas com idade até trinta dias, sendo as cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae), lagarta-elasma *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae), lagarta-rosca *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1767) (Lepidoptera: Noctuidae) e lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) as mais relevantes (CRUZ, 1998). Viana e colaboradores (2006) destacaram o percevejo-castanho *Scaptocoris castanea* (Perty, 1830) (Hemiptera: Cyrenidae), larva-aramé *Conoderus scalaris* (Germar, 1824) (Coleoptera: Elateridae), larva-angorá *Astylus variegatus* (Germar, 1824) (Coleoptera: Dasytidae) e larva alfinete *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) que são pragas iniciais que merecem atenção. Essas pragas são caracterizadas por causar diminuição no número de plantas na área de cultivo e conseqüente perda do potencial produtivo. Apresentam hábitos subterrâneos ou superficiais e quase sempre passam despercebidas pelo produtor (CRUZ et al., 1997).

De acordo com Cruz (2013) os danos causados por pragas entre as fases vegetativas e reprodutivas do milho podem variar de acordo com o estágio fenológico da planta, condições edafoclimáticas, sistema de cultivo e fatores bióticos localizados. As pragas foliares, em plantas acima de trinta dias, são representadas pelo curuquerê-dos-capinzais *Mocis latipes* (Guenée, 1852) (Lepidoptera: Noctuidae) e a *S. frugiperda* e pulgão do milho *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) (Hemiptera: Aphididae). Em relação às espigas, lagarta da espiga do milho *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) e especialmente a *S. frugiperda* destacando-se, sendo a última, a mais importante praga da cultura do milho (CRUZ, 1998; VIANA; CRUZ; WAQUIL., 2006), podendo diminuir em até 34% o rendimento dos grãos (CRUZ, 1995).

### **2.3. Taxonomia e biologia de *Spodoptera frugiperda***

A espécie *S. frugiperda* foi primeiramente descrita por (SMITH, 1797) como pertencente ao Reino: Animal; Filo: Arthropoda; Classe Insecta; Ordem: Lepidoptera; Família: Noctuidae; Gênero: *Spodoptera*; Espécie: *Spodoptera frugiperda*. Reconhecida como praga nos Estados Unidos desde sua identificação, a *S. frugiperda* é amplamente distribuída pelo mundo, sendo bastante encontrada nas Américas e Ilhas a Oeste da Índia tornando-se uma importante praga mundial (CRUZ, 1995; POGUE, 2002).

O gênero *Spodoptera* é integrado por trinta espécies com distribuição cosmopolitas, comumente encontradas em ambientes de clima quente, com distribuição principalmente tropical e subtropical, tendo algumas incidências de espécies em regiões temperadas (POMARI, 2013). No Brasil por conta de um ambiente favorável e alimentação diversificada durante todo o ano sua distribuição ocorre em todas as regiões do país (CRUZ, 1995; POGUE, 2002). A praga teve seu primeiro grande surto em 1899, nos Estados Unidos, onde causou severos danos em culturas como milho, sorgo, trigo, feijão e arroz, e em 1902, 40.000 acres foram devastados pela praga. No Brasil, em 1964 um surto foi relatado, no qual, danos às culturas do milho, arroz e pastagens foram enormes (CRUZ, 1995).

É a principal praga do milho no Brasil, e nos últimos anos sua incidência vem aumentando cada vez mais, alguns fatores responsáveis por esse aumento é o desequilíbrio biológico pela eliminação de seus inimigos naturais e pelo grande aumento da exploração da cultura do milho, sendo cultivado por todas as regiões brasileiras, durante todo o ano (CRUZ; MONTEIRO, 2004).

É um inseto de metamorfose completa, ou seja, seu ciclo de vida passa por quatro etapas distintas, sendo elas a fase de ovo, lagarta, pupa e adulto. A mariposa deposita seus ovos agrupados, em “massa”, comumente na folha da planta, esta massa contém em média 100 ovos. Dependendo da variação da temperatura o período de incubação varia, em temperaturas em torno de 25 a 30 °C durando em média três dias. Em temperaturas inferiores este período estende-se por até oito dias (CRUZ, 1995; CRUZ; MONTEIRO, 2004).

Após eclosão dos ovos e conseqüente surgimento das lagartas, observam-se os primeiros sintomas de danos desta praga, as “folhas raspadas” começam a ser bastante perceptíveis e com o decorrer do crescimento das lagartas, os danos se tornam maiores, chegando até a formação de furos nas folhas com conseqüente “migração” das lagartas para o cartucho da planta de milho. A fase de lagarta normalmente é representada por seis instares, e a duração de cada instar varia de acordo com a temperatura. Quanto mais avançado o estágio da lagarta maior os danos causados à planta, pois com maior intensidade ela irá se alimentar (CRUZ, 1995; CRUZ; MONTEIRO, 2004).

Durante o dia, as mariposas são notadas próximas ao solo ou em folhas do cartucho do milho e podendo diferenciar os machos das fêmeas pela coloração do primeiro par de asas, sendo estes com presença de manchas e uma coloração característica em forma de “V”, e as fêmeas com uma coloração mais acinzentada ou parda como cor de palha (ZENKER; SPECHT; CORSEUIL, 2007).

A *S. frugiperda* destaca-se por se alimentar de mais de 80 espécies de plantas, tendo o milho como a sua principal cultura alimentar (POGUE, 2002; CRUZ; MONTEIRO, 2004). Estudos feitos por (BARROS; TORRES; BUENO, 2010) relataram que apesar de não haver diferença significativa na preferência da lagarta do cartucho em ovipositar em folhas do milho, milheto, soja ou algodão, seu período de desenvolvimento de lagarta menor quando criadas em folhas do milho, mostrando que essa cultura pode proporcionar maior número de gerações e conseqüentemente maiores danos.

#### **2.4. Importância econômica de *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho**

Tendo em vista a grande importância econômica que a cultura do milho tem no mundo, é relevante que levemos em conta a capacidade das pragas-chaves dessa cultura em causar danos econômicos, com isso o dimensionamento dos prejuízos causados pela *S. frugiperda* se faz necessário para nos mostrar o quanto se perde monetariamente quando não combatemos essa praga de maneira eficiente e segura. De acordo com Farinelli e Fornasieri Filho (2006)

dependendo da cultivar, há variação nos danos foliares, sendo estas cultivares mais suscetíveis ao ataque da lagarta na época da safrinha. Danos provocados por *S. frugiperda* podem ocasionar perdas de mais de 400 milhões de dólares por ano na produção de milho (CRUZ, 1998).

De acordo com Waquil e Vilella (2003), estima-se que no Brasil a *S. frugiperda* é responsável por mais de 25% dos prejuízos causados por pragas e conseqüentemente pela maior parte dos quase 40 milhões de dólares gastos com inseticidas, resultando num custo anual de aproximadamente 250 milhões de dólares. Ferreira Filho et al. (2010) dimensionaram o custo econômico da *S. frugiperda* na cultura do milho no Brasil, e constataram que o valor econômico para controle da lagarta pode variar de R\$ 97,28/ha a R\$ 122,56/ha entre os estados mais produtores, com um custo econômico agregado no Brasil ultrapassando aproximadamente R\$ 758,00 milhões, sendo a região Nordeste responsável por quase 30% desse custo econômico total.

A importância econômica da *S. frugiperda* não se restringe apenas ao investimento de inseticidas, mas também a utilização de recursos financeiros e pesquisas destinadas ao combate desta praga, levando ao surgimento de vários híbridos de milho transgênicos com utilização da tecnologia *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Avaliando a produtividade e danos causados por *S. frugiperda* em híbridos de milho convencionais e transgênicos, Moraes et al. (2012) verificaram que a produtividade (Kg/ha) dos híbridos convencionais atingiu os menores valores quando comparados a sua versão transgênica e conseqüentemente com danos mais severos.

A utilização de transgênicos produzidos a partir do *Bt* tem sido uma ferramenta bastante útil nos últimos 20 anos para o controle de pragas, tendo reduzido o número de aplicações de inseticidas sintéticos em 11 países da América Latina, contudo uma das ameaças da cultura *Bt* é a indução de resistência nas pragas-alvo. Mesmo com o emprego dessa tecnologia, foi observado em seis países da América Latina, incluindo no Brasil, que a praga *S. frugiperda* é a única que além do uso de cultivares *Bt* também necessita da aplicação de inseticidas químicos, ou seja, das 31 pragas controladas por culturas *Bt*, ela é a única que mostrou tolerância a certas proteínas *Bt* (BLANCO et al., 2016). Tais dados reforçam a grande importância econômica dessa praga no cenário nacional e mundial, visto que mesmo com o investimento de altas tecnologias para seu combate, seu controle não é garantido, isso mostra que a utilização e adoção de várias técnicas em conjunto se torna cada vez mais viável para controle desse artrópode, sendo o Manejo Integrado de Pragas (MIP) uma solução promissora.

## 2.5. Manejo integrado de *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho

Os insetos-pragas no setor agrícola têm movimentado cerca 1,3 trilhões de dólares por ano devido aos danos econômicos ocasionados por seus ataques às culturas em produção. Decorrente disso, muitos inseticidas têm sido aplicados para controle dessas pragas, com intuito de minimizar seus danos. Porém uma visão sustentável, com questões ambientais, e buscando a melhoria da saúde humana, intensificaram os programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), no qual, encontramos inserida a técnica do controle biológico de pragas, como uma alternativa para minimizar o uso de inseticidas químicos (WRIGHT, 2014).

Dentre os tipos de controle biológico de pragas existe o Controle Biológico Clássico (CBC), que se baseia na utilização de inimigos naturais do local de origem da praga (normalmente uma praga exótica), que são introduzidos nas áreas com o problema a fim de combater e reduzir a população da praga. Outra opção é o Controle Biológico Aumentativo ou Aplicado (CBA), muito usado em casas de vegetação. Esse tipo de controle se utiliza de repetidas inserções de inimigos naturais da praga, muito similar ao modo de uso dos agrotóxicos convencionais. Existe também o Controle Biológico Natural ou Conservativo (CBN), refere-se ao uso de inimigos naturais das pragas que ocorrem naturalmente no ambiente. Ou seja, faz-se por meio da conservação, preservação desses organismos, como, por exemplo, pela manipulação do ambiente, promovendo condições adequadas para uma maior sobrevivência desses inimigos naturais, a fim de diminuir o uso de agroquímicos (WRIGHT, 2014).

Por sua importância econômica mundial, a *S. frugiperda* é alvo de intensas pesquisas com objetivo de manter seu controle nas lavouras abaixo dos níveis de dano econômico ao produtor. Dentre as várias alternativas usadas de controle biológico com fins de sustentabilidade ambiental e para a segurança da saúde humana, o uso de inimigos naturais e bioinseticidas estão se destacando quando em comparação ao uso dos agrotóxicos. De acordo com a Embrapa, Milho e Sorgo, o uso de organismos benéficos que suprimem as pragas é uma alternativa viável no controle de insetos-praga. Por exemplo, o uso de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae), uma vespa parasitoide de várias espécies de insetos, fácil reprodução em laboratório e de custo monetário baixo, é uma ótima opção de manejo e controle da lagarta-do-cartucho (CRUZ; MONTEIRO, 2004).

## 2.6. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho

Os grandes prejuízos causados na cultura do milho não estão ligados à ausência de tratamentos fitossanitários, uma vez que há muitas aplicações de compostos químicos no decorrer do plantio e isso tem aumentado com os anos, em algumas áreas produtoras são usadas mais de cinco aplicações de agrotóxicos durante a safra (FIGUEIREDO et al., 2006). Atualmente, existem relatos de até quinze ou mais aplicações, sem sucesso de supressão da *S. frugiperda*. Mesmo com o crescente número de aplicações de inseticidas químicos é visível a ocorrência de populações resistentes de *S. frugiperda*. Isso aumenta ainda mais os danos causados por essa praga, visto que a diversidade de agentes de controle biológico tem seu número diminuído por conta do uso inadequado de inseticidas químicos usados nas lavouras de milho. Tal diminuição desses agentes do controle biológico, como inimigos naturais, eleva os danos causados por *S. frugiperda* (CRUZ, 2002; FIGUEIREDO et al., 2006).

Outro efeito da aplicação indiscriminada de agentes químicos na cultura do milho é a manifestação de resistência acelerada nas populações de *S. frugiperda*. Na tentativa de impedir tal progresso da resistência em populações desta praga, é importante o uso de táticas de MIP, da qual a utilização de controle biológico é uma das alternativas mais viáveis em substituição ao uso do controle químico, sendo uma das táticas mais utilizadas na supressão de insetos-praga que adquiriram resistência aos agrotóxicos (CRUZ, 2002).

Um importante inimigo natural de lagartas desfolhadoras, fase jovem da *S. frugiperda* na cultura do milho, são os insetos vulgarmente conhecidos como “tesourinha”, os quais são predadores tanto dos ovos quanto dos primeiros instares das lagartas de *S. frugiperda*. Outros agentes de controle desta praga são os parasitoides, como o *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, *T. pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae), *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae), *Campoletis flavicineta* Ashmead (Hymenoptera: Ichneumonidae) e *Chelonus insularis* Cresson (Hymenoptera: Braconidae), além da espécie de tesourinha predadora *Doru luteipes* Scudder (Dermaptera: Forficulidae) (CRUZ, 1995).

Salienta-se que dentro do contexto do MIP, mesmo com o uso em proporções corretas de inseticidas químicos associados ao controle biológico por inimigos naturais, algumas dessas combinações podem apresentar consequências drásticas, caso o produto químico não seja seletivo, pois afetará os organismos benéficos, a exemplo os entomopatógenos, parasitoides ou predadores usados no controle biológico, impedindo o controle efetivo das pragas (FIGUEIREDO, 2001).

### 2.6.1. Microrganismos no controle biológico de *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho

Quando comparados aos inseticidas químicos, os biopesticidas microbianos são bem menos explorados e utilizados no controle da lagarta-do-cartucho do milho. Por outro lado, análises a respeito de inseticidas microbianos são mais comuns em outras culturas, como a do algodão. A exemplo, o biopesticida à base de um fungo entomopatogênico, *Beauveria bassiana*, já comercializado e disponível no mercado, e muito eficaz no controle do complexo de lagartas no algodoeiro (MOINO JR.; ALVES, 1997; MARTINS et al., 2009).

Avaliações de eficiência com inseticidas químicos e microbianos realizados por Martins (2009) comprovaram que não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos analisados sobre a mortalidade da lagarta-do-cartucho do milho, indicando que novas pesquisas sejam realizadas promovendo o uso de microrganismos entomopatogênicos no combate a *S. frugiperda*, minimizando desta forma os impactos indesejados promovidos pelos produtos sintéticos.

Inseticidas microbianos à base bactérias têm sido relatados desde os anos 70, sendo uma excelente alternativa ao uso de compostos químicos. No entanto, as pesquisas no entorno desses entomopatógenos ganhou significância na década de 90 em virtude do acréscimo no apelo ambiental e ecológico contra o mercado dos produtos fitossanitários. Bactérias pertencentes ao grupo *Bacillus* são as mais estudadas e importantes para o controle biológico de insetos-praga, produzindo cristais que são tóxicos quando ingeridos pelo inseto, como por exemplo a espécie *Bacillus thuringiensis*, responsável por combater lepidópteros-praga nos sistemas agrícolas (SOUZA, 2001).

Salienta-se que para uso no controle biológico, devemos nos restringir às bactérias esporulantes, como é o caso do gênero *Bacillus* e *Clostridium*. O *Bacillus* tem capacidade de produzir endósporos e toxinas, que são as causas de sua alta eficiência no combate às pragas. As toxinas produzidas por *B. thuringiensis*, cristal e a  $\beta$ -toxina, são as responsáveis pela atividade inseticida. Insetos infectados tem perda de apetite, diarreia, regurgitam, as lagartas ficam flácidas e paralisadas, com morte prevista entre 18 e 72 h após infecção (JUNIOR, 2011).

De acordo com Barbosa et al. (2011), estudos sobre a ação de inseticidas biológicos no controle da *S. frugiperda*, em condições de campo, comprovaram que isolados de *B. thuringiensis* apresentam ótimos resultados de controle desta praga, relataram ainda que foi o

organismos mais patogênico às lagartas desse inseto. Apesar de promissores, os estudos no entorno de entomopatógenos no controle de pragas ainda são insuficientes.

#### 2.6.2. Bioinseticidas microbiano

Bactérias como *B. thuringiensis* têm a capacidade de síntese de cristais de proteínas por genes denominados *cry*. São essas proteínas as responsáveis pelo controle de insetos-praga, como por exemplo, lagartas da ordem Lepidoptera, caso da espécie *S. frugiperda*. Seus estudos estão relacionados tanto ao isolamento e mapeamento de genes *cry* para modificação genéticas de cultivares resistentes, formação de plantas transgênicas, como também para formulação de biopesticidas para controle biológico (FIUZA et al., 2012).

Quando ingerido pelo inseto os cristais presentes no *B. thuringiensis* são solubilizados e as protoxinas em presença das enzimas digestivas dos insetos as convertem em quatro ou mais polipeptídios tóxicos (endotoxinas). Essas endotoxinas promovem uma alta permeabilidade da membrana do intestino médio do inseto levando a uma grande absorção de água que causa lise celular e conseqüentemente rupturas do intestino médio levando o inseto a morte (COPPING; MENN, 2000).

Encontrar novas cepas com uma ótima atividade inseticida tem sido muito desejado no campo de estudo dos insetos-praga, principalmente cepas bacterianas com uma maior atuação sobre esses organismos, com maior eficiência e toxicidade, porém, específicas a alguns grupos, evitando impactos sobre outros organismos não alvos.

Algumas bactérias do gênero *Bacillus*, como cepas de *Bacillus subtilis*, tem sido descritas como ótimas produtoras de biossurfactantes, é um tensoativo biológico, com várias aplicações, como atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica, além de sua utilização no controle biológico contra fitopatógenos formadores de zoósporos (STANGHELLINI; MILLER, 1997; PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999).

Outra característica bastante atraente dos biossurfactantes é sua baixa toxicidade ao meio ambiente e sua biodegradabilidade, diferente de compostos químicos usados no controle de pragas (YIN et al., 2009; FERNANDES, 2011).

De acordo com Parreira et al. (2013), biossurfactantes isolados de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* mostraram atividade inseticida sobre larvas e adultos de *Culex* sp. e *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae), onde após 96 horas de exposição somente 25% do total de espécimes estavam vivas. Biossurfactantes extraídos de bactérias de solo contaminado com hidrocarbonetos do petróleo mostraram atividade inseticida, larvicida e repelente

(AYER, 2014). Tais resultados enfatizam estudos mais aprofundados de biossurfactantes para seu uso como biopesticida, sendo uma possível e promissora alternativa aos inseticidas químicos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Criação de *Spodoptera frugiperda*

As coletas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) foram realizadas de maneira direta com auxílio de rede entomológica e pincéis de ponta fina, respectivamente, para adultos e lagartas, em campo de produção de milho, contendo a variedade AG 1051 com tripla aptidão (milho em grãos, silagem e milho verde), nos municípios de Limoeiro do Norte - CE e Upanema - RN.

Imediatamente após as coletas, os espécimes eram acondicionados em recipientes de plástico, com capacidade de 1,0 L, contendo em seu interior pedaços de folhas de milho coletas na própria área em produção, e vedados na sua extremidade superior com tampa do mesmo material, porém contendo pequenas perfurações para permitir as trocas gasosas entre o meio interno e externo, mantendo a sanidade dos insetos coletados. Em seguida, o material foi transferido para o Laboratório de Seletividade de Produtos Químicos (LSPQ) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), onde foram identificados os espécimes com auxílio de microscópio estereoscópio (aumento de 10 vezes) e baseando-se em chaves dicotômicas propostas por Zucchi et al. (1993), dando início em seguida a uma criação massal de *S. frugiperda*.

Após a emergência os adultos foram sexados, por características morfológicas (CRUZ, 1995), principalmente a cor das asas (Figura 2). A criação das lagartas de *S. frugiperda* ocorreu por meio do fornecimento de dieta natural (folhas de milho da variedade híbrida 1051, da Agrocere<sup>®</sup>), com idade de 20 a 40 dias, cultivadas em vasos presentes em casa de vegetação e área adjacente à casa de vegetação, ambas no interior da UFERSA. As sementes de milho foram plantadas em vasos de Cloreto de Polivinila (PVC) de capacidade para 5,0 L que foram mantidos na casa de vegetação e diretamente no solo, em uma área 1,5m<sup>2</sup> nas denominações da UFERSA, permitindo assim a manutenção do alimento das lagartas da criação massal e daquelas que foram utilizadas nos bioensaios.

Os vasos em que as sementes de milho foram semeadas continuam uma combinação de solo e matéria orgânica a base de esterco bovino e palhas de arroz da empresa Integra Agroindustrial Nutrição Vegetal<sup>®</sup>, obtida na fazenda da UFERSA. A irrigação das plantas de milho ocorreu duas vezes ao dia. Para garantir melhor propagação vegetativa 15 dias após a

germinação adicionou-se aproximadamente 3g de ureia em cada vaso e 50g por linha de plantio, para garantir níveis viáveis de nitrogênio no solo.

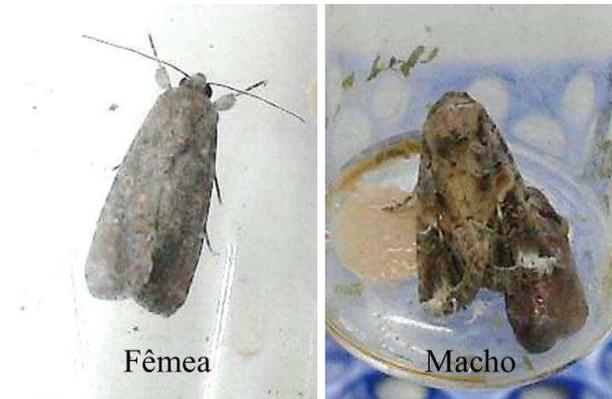


Figura 1. Adultos (Fêmea e Macho) de *S. frugiperda* após a emergência.

As lagartas provenientes das coletas e/ou obtidas na criação massal foram em condições de laboratório, individualizadas em tubos de ensaio de 8,0 cm de comprimento por 2,0 cm de diâmetro e alimentadas *ad libitum* diariamente com folhas do milho AG 1051, isentas de resíduos tóxicos, até o período de pupa (Figura 2). A manutenção dos adultos de *S. frugiperda* foi adaptada na metodologia proposta por Giolo et al. (2002).

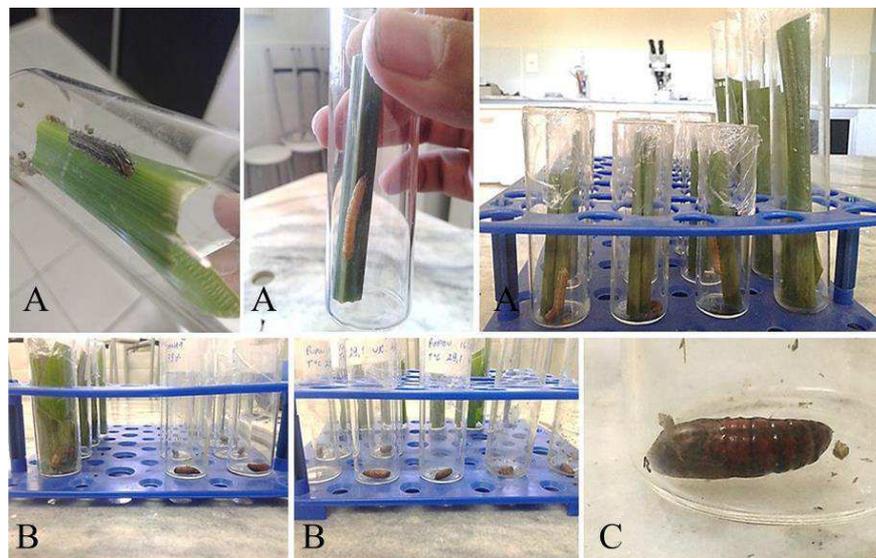


Figura 2. Criação de *S. frugiperda* coletadas em campo (A), Lagartas alimentadas com folhas de milho, início do estágio de pupa (B) e Fase de pupa obtida em laboratório (C).

Após sexagens dos adultos, como citado acima, foram acondicionados na razão de 3,0 a 4,0 casais por gaiolas PVC com aproximadamente 20 cm de altura e 10 cm de diâmetro. As

gaiolas foram forradas internamente com papel toalha e vedadas em uma das extremidades (superior) por uma tela fina de tecido tipo *voil* e na outra extremidade (basal) apoiada em uma placa de Petri de aproximadamente 15 cm de diâmetro. A dieta dos adultos foi constituída de uma solução de mel a 10% (Figura 3). As posturas foram coletadas diariamente e armazenadas em *Beckers* de capacidade de 600 mL, forrados na parte interna com papel toalha umedecido. Após eclosão dos ovos, as lagartas de 1º instar foram alimentadas com folhas de milho *ad libitum* no mesmo *Becker* e, em seguida, individualizadas em tubos de ensaio de vidro com 8,0 cm de comprimento por 2,0 cm de diâmetro 2º ou 3º dia após eclosão, onde foram mantidas até a obtenção das pupas. A sala de criação massal foi mantida a uma temperatura média de  $27 \pm 2$  °C e uma UR de  $40 \pm 5\%$ , adaptado de metodologia proposta de Giolo et al. (2002), e fotofase de 10 horas.

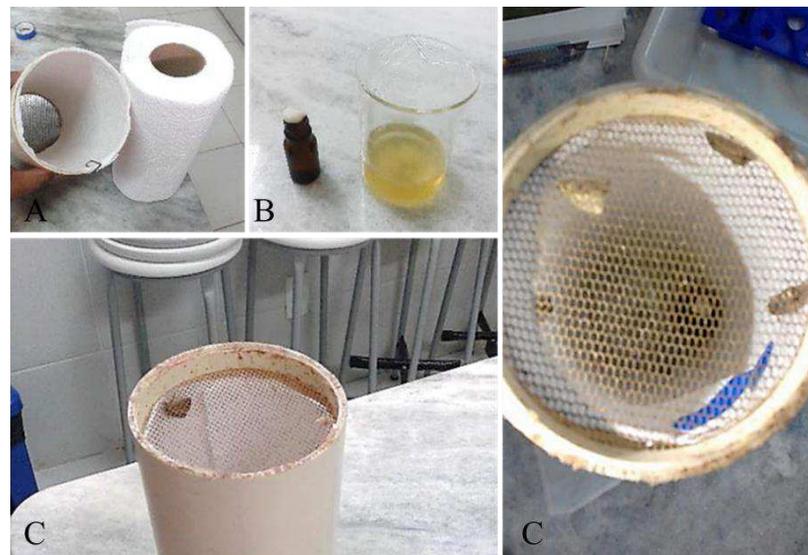


Figura 3. Confeccção da gaiola de criação (A), Solução de mel a 10% para alimentação dos adultos (B) e Gaiola com adultos de *S. frugiperda* (C).

A biologia de *S. frugiperda* foi analisada a partir de espécimes da geração F2 provenientes da criação massal em condies controladas de laboratório, os estdios de lagartas e pupas foram mantidos a temperatura média do laboratório de 27,2 °C com UR de 43%; j para os adultos emergidos, foi de 27,6 °C e UR de 42%. O fotoperdio em todo o tempo de conduo do experimento foi de 10 horas. Os bioensaios foram realizados a partir da terceira geração das lagartas (F3) obtida na criação massal em condies de laboratório, sendo utilizada parte da populao para os experimentos e outra parte mantida para continuidade da criação massal.

### 3.2. Biologia de *Spodoptera frugiperda* in vitro

Espécimes da criação massal de *S. frugiperda* citada no item 3.1, da geração F2 foram utilizadas visando estudos da biologia de *S. frugiperda* em condições de laboratório. Foram utilizadas 17 lagartas de 1º instar, as quais foram individualizadas em tubos de ensaio de vidro de 8,0 cm de comprimento por 2,0 cm de diâmetro, logo após eclosão dos ovos e mantidas nessa mesma condição até a sua pupação e emergência dos adultos, em condições laboratoriais controladas de temperatura, umidade relativa e fotoperíodo, que foram registradas duas vezes ao dia, uma pela manhã e outra à tarde. Foram analisados os seguintes parâmetros biológicos: tempo larval, pupal, e a razão sexual. A razão sexual é um valor obtido com base nas proporções de macho e fêmeas que emergiram, o cálculo foi realizado contando o número de fêmeas da população e dividindo pelo número total da população, conforme a fórmula: Razão Sexual (RS) = número de fêmeas/ (número de fêmeas + número de machos), sendo, RS > 0,5 (maior número de fêmeas); RS < 0,5 (maior número de macho) e; RS = 0,5 (mesmo número de machos e fêmeas) (SILVEIRA NETO et al., 1976).

### 3.3. Cultivo bacteriano e fermentação

A concentração bacteriana da cepa testada foi relatada pela técnica da microgota, a qual é caracterizada pela contagem de células viáveis em 24 h de crescimento. Baseando-se em Andrade et al. (1994), a técnica da microgota consistiu em avaliarmos o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) em uma placa com Ágar Nutritivo (AN) em que microgotas de 10µl foram depositadas após diluição seriada. De acordo com a técnica, é padronizada uma concentração de 10<sup>8</sup> UFCs, que é base para manipulação bacteriana.

Para a realização dessa técnica, uma colônia de uma placa com 24 h de crescimento foi alçada e inoculada em 5 mL Caldo Nutritivo (CN) e deixado para crescer em estufa a 37 °C por 18 h. Em seguida a diluição seriada foi executada adicionando-se 500 µl da cultura pura em 4,5 mL de solução salina 0,9% mais Tween 80 a 0,3% e assim sucessivamente até a diluição de 10<sup>-6</sup>. Imediatamente após obtenção das diluições de 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> e 10<sup>-4</sup>, 4 gotas foram depositadas em diferentes quadrantes em uma placa de Petri contendo meio AN e armazenadas em estufa por 24h, para posterior contagem das UFCs e determinação da concentração da cepa 358.1 após 24h de crescimento (adaptado de ANDRADE et al., 1994; ROMEIRO, 2007). De acordo com os cálculos realizados após a leitura da microgota,

verificou-se que a cepa 358.1 estava na concentração de  $4 \times 10^8$  UFC/mL e não necessitava de diluições.

Essa cepa foi anteriormente caracterizada como uma gram negativa e em forma de bastonetes (Figura 4), com capacidade de crescimento na presença ou ausência de oxigênio, ou seja, são anaeróbias facultativas com crescimento ótimo a temperatura de 35 °C a 37 °C, a exemplo dos relatos realizados por Ferreira (2013) e Gomes (2014). Tais características estão presentes no gênero *Bacillus*, levando a indícios da cepa 358.1 pertencer a esse gênero. Estudos do RNAr 16S devem ser realizados posteriormente com o intuito de confirmar tal evidência da cepa 358.1 utilizada nos presentes bioensaios visando o controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).

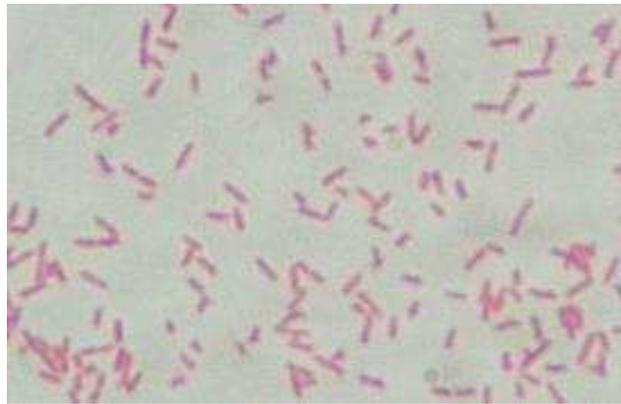


Figura 4. Característica morfológica da linhagem 358.1 em lâmina corada pelo método de Gram e fotografada em microscópio óptico com aumento de 1000 x (GOMES, 2014).

Além de determinar a concentração bacteriana que foi utilizada nos ensaios, testes de pH foram realizados para garantir que a cepa bacteriana 358.1 tivesse atividade e viabilidade no intestino médio da lagarta (mesêntero) após ingerir folhas de milho previamente contaminadas com a cepa bacteriana. Os testes consistiram na correção do pH em tubos cônicos de 10 mL contendo caldo nutritivo com um com auxílio de um peagâmetro. Uma colônia da cepa 358.1 foi adicionada a 5 mL de CN em tubos cônicos de 10 mL que variavam de pH 3 a pH 11, e mantidos para crescimento nas mesmas condições de cultivo realizadas nos testes de microgota e posterior fermentação bacterina para aplicação nos ensaios. Os resultados do crescimento nas variações de pH testadas garantiram que a bactéria teria capacidade de chegar ao mesêntero das lagartas com capacidade de sobreviver no pH local, com possível viabilidade de proliferação, uma vez que o pH no mesêntero dos insetos varia entre 8 e 10 (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995).

### **3.4. Toxicidade da cepa bacteriana 358.1 sobre lagartas de 3º instar de *S. frugiperda* em arenas foliares não esterilizadas**

Para os testes de toxicidades, utilizou-se a fermentação bacteriana de duas formas, a primeira para obtenção de uma cultura de células da cepa 358.1, que foi um cultivo simples em CN, semelhante ao crescimento para microgota, de modo que, uma colônia em placa com 24 h de crescimento foi alçada e adicionada em 5 mL de CN e mantido para crescimento em estufa bacteriológica por 24 h a 37 °C. Ao final desse tempo, com a cultura fermentada foram realizadas duas diluições em solução salina a 0,9% (50 e 75% da concentração total). Após diluições prosseguiu-se com os três tratamentos à base de células bacterianas em meio líquido nas concentrações de 100, 75 e 50% para testes sobre larvas de 3º instar de *S. frugiperda*.

Na segunda fermentação, a produção de biossurfactante foi realizada com a fermentação bacteriana da cepa 358.1 em meio mineral constituindo de 1,0 g de sulfato de amônio; 10,0 g de glucose; 6,0 g de fosfato dissódico; 5,0 g de extrato de levedura; 3,0 g de fosfato de potássio monobásico; 2,7 g de cloreto de sódio e 0,6 g de sulfato de magnésio heptahidratado por litro de água destilada (MORÁN et al., 2000; PEREIRA et al., 2013), com modificações. Com meio pronto, foi acrescentado 0,1% (v/v) de solução de micronutrientes de acordo com Sar e Rosenberg (1983).

Para o preparo do inóculo, uma colônia com 24 h de crescimento em placa com Ágar Nutritivo (AN) foi adicionada em 5 mL do meio mineral já citado anteriormente e cultivado sob agitação contínua a 150 rpm, a 30 °C por 24 h. Após este período, a suspensão celular em fase exponencial foi adicionada, em uma proporção de 10% (v/v), em *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 45 mL do mesmo meio mineral do inóculo. A cultura foi incubada sob as mesmas condições do inóculo, porém por 48h. Após esse tempo o meio foi centrifugado a 9.000 g por 10 min para separação das células. O sobrenadante foi utilizado em testes de atividade tensoativa, como descrito por Youssef et al. (2004) com modificações, para verificação da produção de biossurfactante. Esse método consiste em depositar cuidadosamente petróleo bruto em aproximadamente 30mL de água destilada em placa de Petri com diâmetro e 10cm. Consequente 200 µl do sobrenadante da cultura foi adicionado no centro da placa e o halo de ruptura no óleo bruto foi medido. No mesmo dia o sobrenadante da cultura de células foi utilizado como tratamento e testado nos ensaios para controle de lagartas de *S. frugiperda* e seus efeitos no seu desenvolvimento.

De posse da cepa bacterianas de 358.1 e seu sobrenadante, foram analisadas às eficiências de controle sobre os insetos. Para os testes de toxicidade em lagartas de 3º instar em arenas

foliares não esterilizadas foram realizados com seis tratamentos: controle negativo (solução salina a 0,9%); controle positivo (45 g i.a./ ha de fenpropratrina - inseticida sintético); sobrenadante da cepa bacteriana 358.1; cultura de células em meio líquido da cepa 358.1 em sua concentração total; cultura de células diluído a 75% da concentração total e cultura de células diluído a 50% da concentração total. Foram utilizadas 96 lagartas nesse bioensaio, tendo cada tratamento oito repetições constituídos cada um por duas lagartas.

Tendo como base o tempo após a eclosão dos ovos e avaliações diárias da morfologia das lagartas, conseguiu-se distinguir o estágio larval em que se encontravam. Com 8 dias após a eclosão dos ovos as lagartas se encontravam no 3º instar, como mostra a figura 5 (PRAÇA; NETO & MONNERAT, 2006).



Figura 5. Lagartas de *S. frugiperda* no 3º instar (A), Exúvia liberada após a troca de tegumento (B), Muda (C).

Para a aplicação dos tratamentos, arenas foliares de milho com dimensões de 4,0 x 4,0 cm, obtidas com auxílio de régua e tesoura, foram cortados e depositadas uma a uma em placas de Petri de 10cm de diâmetro. Em seguida os tratamentos foram cuidadosamente aplicados com o auxílio de uma pipeta de volume variável de 100  $\mu$ L no volume de 24  $\mu$ L por folha.

Após uma hora da aplicação dos produtos analisados e absorção dos mesmos pelas áreas foliares, lagartas de *S. frugiperda* no 3º instar foram transferidas sobre as arenas foliares utilizando pincel de ponta fina, uma lagarta por placa, evitando desta forma o canibalismo.

Foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos: taxa de mortalidade nos tempos 1, 6, 12, 24h após pulverizações e em seguida, 1 vez ao dia em intervalos de 24 horas, até a morte da lagarta, pupação e emergência do adulto (taxa de mortalidade acumulada); efeitos no desenvolvimento das lagartas sobreviventes também foram observados (inviabilidade pupal e má formação morfológica de adultos oriundos de lagartas de 3º instar contaminadas pelos tratamentos).

### **3.5. Toxicidade da cepa bacteriana 358.1 sobre lagartas de 3º instar de *S. frugiperda* em arenas foliares esterilizadas**

Para avaliação da toxicidade da cepa 358.1 e sobrenadante da cultura sobre lagartas do 3º instar, agora em arenas foliares esterilizadas, o cultivo e fermentação bacteriano da cepa 358.1 para elaboração dos tratamentos consistiu exatamente como foi descrito no 3.4, porém sem a utilização das diluições a 75 e 50% da concentração total da cultura. Com isso os tratamentos testados nesse experimento foram: cultura celular da cepa 358.1 em sua concentração total; sobrenadante da cepa 358.1; controle negativo (água destilada); e controle positivo (72 g i.a./ha de flubendiamida - inseticida sintético).

Antes da aplicação dos tratamentos, as folhas utilizadas no experimento foram coletadas e levadas para o Laboratório de Ecologia de Microrganismos (LEMIC) e foram esterilizadas com luz ultravioleta (UV) em cabine de segurança biológica, onde buscou-se minimizar qualquer influência de uma contaminação quando os tratamentos fossem aplicados.

As aplicações dos produtos em teste foram realizadas em discos foliares de aproximadamente 2,0 cm de diâmetro obtidos de folhas de milho perfuradas com furador de metal. Os discos foram transferidos para placas de Petri de 10 cm de diâmetro com auxílio de pinça de aço inoxidável de ponta fina, para posterior aplicação dos tratamentos. Foram aplicados 24 µL por folha e postos para secar durante uma hora, antes de ofertar para a alimentação dos insetos. Em seguida as lagartas foram adicionadas uma por placa como descrito no item 3.4. Avaliou-se a taxa de mortalidade 1, 6, 12 e 24h após aplicação dos tratamentos, e posteriormente em intervalos de 24 horas, até a morte da lagarta, pupação ou emergência do adulto (taxa de mortalidade acumulada). Efeitos subletais no desenvolvimento das lagartas sobreviventes também foram observados (inviabilidade pupal e má formação morfológica de adultos oriundos de lagartas de 3º instar contaminadas pelos tratamentos).

### **3.6. Toxicidade da cepa bacteriana 358.1 sobre lagartas de 2º instar de *S. frugiperda* em arenas foliares esterilizadas**

O presente bioensaio com lagartas de 2º instar foi realizado seguindo a metodologia descrita anteriormente (item 3.5). Os tratamentos utilizados foram: cultura celular da cepa 358.1 em sua concentração total; sobrenadante da cultura (biossurfactante); controle negativo (água destilada); e controle positivo (72 g i.a./ ha de flubendiamida - inseticida sintético). Os tratamentos foram aplicados com o auxílio de pipeta de volume variável de 100 µL, no volume de 24 µL sobre discos foliares de aproximadamente 2,0 cm de diâmetro. Lagartas no 2º instar foram adicionadas uma por placa (sobre os discos contaminados) e as taxas de mortalidade foram analisadas 1, 6, 12 e 24 h após aplicação dos tratamentos, e posteriormente em intervalos de 24 h, até a morte da lagarta, pupação ou emergência do adulto (taxa de mortalidade acumulada). Efeitos subletais no desenvolvimento das lagartas sobreviventes também foram observados (inviabilidade pupal e má formação morfológica de adultos oriundos de lagartas de 3º instar contaminadas pelos tratamentos).

### **3.7. Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk com o nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ) para determinar se os dados seguiam uma curva de normalidade. Considerando que os dados tendiam a normalidade (paramétricos), aplicou-se Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ambas com o nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ), para verificar as diferenças significativas entre os grupos testados. Para todos os parâmetros analisados foi utilizado o *software* estatístico SAS (SAS, 1991), com exceção à mortalidade acumulada no tempo para lagartas de 3º instar em áreas foliares não esterilizadas, na qual foi utilizado o *software* estatístico SISVAR (FERREIRA, 1998).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* obtidos em condições *in vitro*

A duração média da fase jovem, lagartas, foi de 15,7 dias, enquanto que a fase pupal foi em média de 8 dias, nas condições ambientais citadas anteriormente. Giolo et al. (2002), ao avaliarem parâmetros biológicos de *S. frugiperda* oriundas de diferentes localidades, verificaram grandes variações no tempo de desenvolvimento das lagartas, e que essas variações ocorreram em virtude da localidade e da planta que estas lagartas foram coletadas. De acordo com esses mesmos autores, lagartas provenientes de áreas com plantas de milho da cidade de Pelotas, RS, e mantidas no laboratório a 25 °C, UR de 70% e fotoperíodo de 14 horas, apresentaram média de 14 dias de desenvolvimento. Para as lagartas de Santa Rosa, RS, nas mesmas condições laboratoriais apresentaram 16 dias em média de desenvolvimento, corroborando com os resultados do presente trabalho. Por outro lado, o tempo em dias da fase de pupa em Santa Rosa, RS demorou aproximadamente 10 dias e em Pelotas, RS a fase pupal foi de aproximadamente 13 dias, diferindo dos oito dias obtidos no presente experimento.

Um dos principais fatores abióticos que influencia o desenvolvimento dos insetos é a temperatura, podendo aumentar ou diminuir seu ciclo de vida, conseqüentemente influenciar o número de voltinismos; portanto, temperaturas médias de 27,2 °C utilizadas neste trabalho podem ter influenciado na redução do tempo da fase de pupa quando comparados aos de outros trabalhos.

As características intrínsecas das populações, como os fatores genéticos, podem interferir no tempo de desenvolvimento dos insetos, principalmente quando influenciado por fatores abióticos como a temperatura e umidade relativa de um determinado ecossistema, bem como, os tratos culturais envolvidos no manejo da cultura onde essas pragas atacam, que também podem interferir no seu tempo de desenvolvimento.

Barros; Torres; Bueno (2010), avaliaram o ciclo de desenvolvimento de *S. frugiperda* em diferentes hospedeiros, sobre condições de 25 °C e fotofase de 12 horas, notaram que o período de desenvolvimento na fase de lagartas quando criadas em folhas de milho foi de 14,5 dias e para pupas foram superiores a 10 dias, diferindo dos resultados obtidos no presente trabalho. O tipo de alimento a que as lagartas são submetidas em laboratório interferem diretamente no seu tempo de desenvolvimento, uma vez que há variação nutricional nas dietas alimentares com folhas de milho, algodão, soja ou as dietas artificiais.

Bortolotto et al. (2016) avaliaram o período de desenvolvimento larval de *S. eridania* e *S. frugiperda* utilizando como alimento espigas de milho *Bt* que expressão proteínas *Cry* e milho não *Bt*. Em seus resultados eles relataram que a média em dias para o período larval no desenvolvimento de *S. frugiperda* foi de 18,4 dias quando utilizado espigas não *Bt*. Tais resultados sugerem que utilizar espigas para alimentação das lagartas podem interferir no tempo larval do inseto, uma vez que no presente trabalho a média do tempo de desenvolvimento larval foi inferior aos valores por eles obtidos quando estas lagartas foram alimentadas exclusivamente com folhas de milho não *Bt*.

Além da variedade e tipo de cultura que será usada para alimentar lagartas em um estudo de biologia ou manutenção de uma criação massal, o manejo nutricional da planta pode afetar no tempo de desenvolvimento do inseto. Um exemplo disso foram os resultados citados por Silva et al. (2014), que observaram que folhas de algodoeiro tratadas com silício, quando fornecidas às lagartas de *S. frugiperda* ocasionaram aumento do tempo de desenvolvimento larval e pupal, sendo 31,1 e 9,97 dias, respectivamente.

A razão sexual da população analisada de *S. frugiperda* foi de 0,71. Em estudo de Giolo et al. (2002), a razão sexual das lagartas de *S. frugiperda* criadas em laboratório apresentaram variação de 0,44 a 0,52, para as coletadas em Pelotas e em Santa Rosa, ambas localizadas no Rio Grande do Sul, diferindo dos resultados obtidos nesse estudo. A razão sexual também é um parâmetro biológico que pode variar de acordo com as condições ambientais que os insetos são submetidos, ao tipo de alimento utilizado para mantê-los, ou ao próprio genótipo de planta que eles são submetidos, podem modificar estes valores (SILVEIRA; VENDRAMIM; ROSSETTO, 1997).

Além do genótipo, o manejo nutricional oferecido às cultivares que servirão de alimento para os insetos podem interferir na razão sexual da população de *S. frugiperda*. Estudo realizado sobre os aspectos biológicos de *S. frugiperda* quando alimentadas com folhas de milho submetidas ao efeito de silício e ácido giberélico GA<sub>3</sub>, promoveram uma maior predisposição para machos (PAROLIN, 2012). A razão sexual de *S. frugiperda*, quando lagartas foram alimentadas com folhas de milho tratadas com fosfito de potássio ocasionou maior índice de machos, com menores índices da razão sexual (OLIVEIRA, 2015).

#### 4.2. Cultivo bacteriano em diferentes pHs e fermentação para produção de biossurfactante

O melhor crescimento da cepa 358.1 foi encontrado nos tubos contendo soluções com pH 5, 6, 7, 8 e 9, proporcionando meio com coloração bastante turvo, sinal de grande proliferação bacteriana; por outro lado, pHs 3, 4, 10 e 11 ocorreram pouca turbidez, tendo o cultivo sido realizado em placa para verificar e garantir o crescimento bacteriano. A figura 6 mostra o crescimento da cepa 358.1 nos diferentes pH testados.

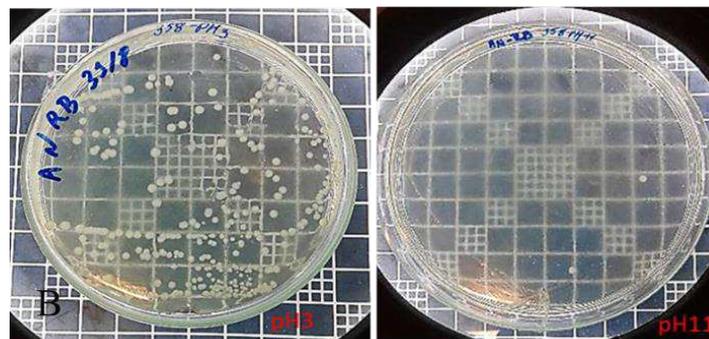


Figura 6. Crescimento da cepa 358.1 em diferentes pHs testados.

Com os resultados positivos obtidos nos testes de pH, considerando que a cepa 358.1 apresentou viabilidade em pH 8 e 9, o mesmo encontrado no mesêntero, intestino médio das lagartas, foram realizadas a fermentações bacterianas, a qual consistiu na preparação do inóculo, seguido da fermentação em *Erlenmeyers* de 250 mL sob agitação contínua de 250 rpm a 30 °C por 48 h. Ao final da fermentação o caldo obtido foi centrifugado para separação das células (*pellet*) do sobrenadante da cultura. Com esse produto biológico, o teste de espalhamento de óleo foi realizado para verificar a presença de biossurfactante (YOUSSEF et al., 2004), como mostra a Figura 7.

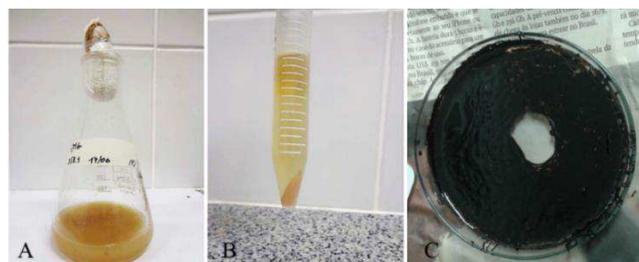


Figura 7. Fermentação em Erlenmeyers de 250 mL (A), Centrifugação do caldo e obtenção do sobrenadante (B), Teste do espalhamento do óleo, produção de biossurfactante (C).

A produção de biossurfactante não foi eficiente, uma vez que o halo de ruptura só atingiu entre 1,0 cm e 2,0 cm de diâmetro (Figura 6 C). Tais resultados diferem dos obtidos por Ferreira (2013) e Gomes (2014), onde estes, trabalhando com a mesma cepa bacteriana 358.1, obtiveram resultados com halos de ruptura acima de 6,0 cm, relatando que houve grande eficiência na produção de compostos tensoativos, como os biossurfactantes. Os valores obtidos no presente trabalho demonstraram que a cepa 358.1 não teve o mesmo desempenho na produção de tensoativos ou biossurfactantes como nos trabalhos anteriormente citados.

#### 4.2.1. Avaliação da cepa 358.1 sobre lagartas de 3º instar *S. frugiperda*

##### 4.2.1.1. Toxicidade de cepa bacteriana 358.1 sobre lagartas de 3º instar de *S. frugiperda* em arenas foliares não esterilizadas

A mortalidade acumulada de lagartas de 3º instar de *S. frugiperda* (Figura 8) relatou que o único tratamento que diferiu estatisticamente dos demais foi o inseticida fenprotrina, e somente 48h após a aplicação dos tratamentos. Os demais produtos não apresentaram diferença estatística entre si nos tempos avaliados. Copping e Menn (2000) avaliaram cepas de *B. thuringiensis* isoladas de solo no controle de lagartas de 1º instar de *S. frugiperda*, e com 120 h após aplicação dos tratamentos, das 385 cepas testadas apenas cinco promoveram mortalidade dos insetos, que variaram de 77 a 100%. Esses resultados diferem dos obtidos no presente ensaio, porém é importante salientar que os autores citados, utilizaram lagartas de 1º instar, as quais tendem ser mais suscetíveis à ação de patógenos quando comparadas às lagartas de 3º instar (LIMA et al., 2010).

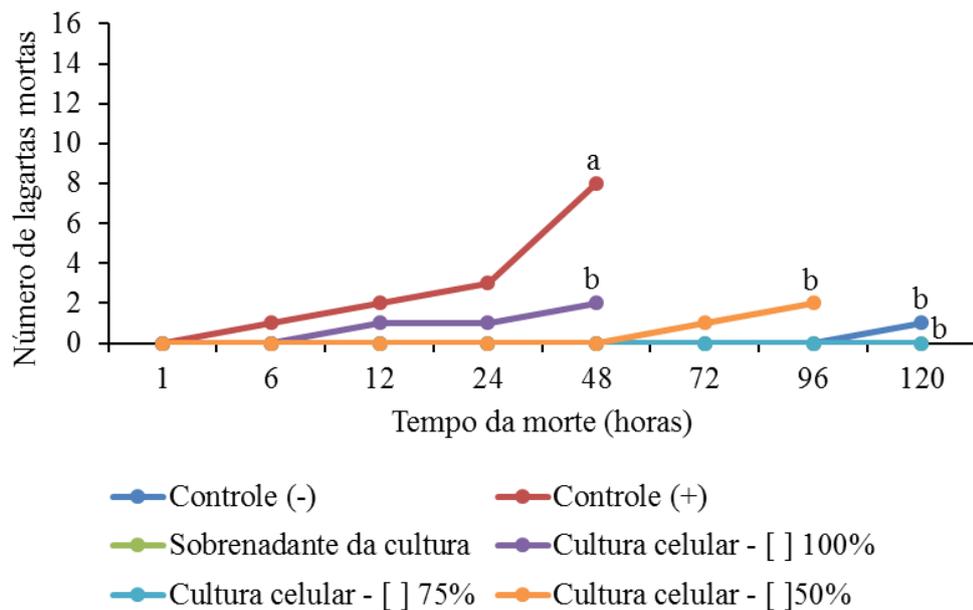


Figura 8. Curva de mortalidade acumulada de lagartas do 3º ao 6º instar ao longo do tempo. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 0,05. Fenpropratrina (+) e solução salina (-).

Em relação à taxa de mortalidade, 50% foi obtido pelo inseticida fenpropratrina, o maior índice, seguido de 12,5% para cultura de células nas concentrações de 100% e 50%, com o sobrenadante da cultura com 0% de mortalidade (Tabela 1). Lima et al. (2009), ao trabalharem com formulados comerciais de nim e *B. thuringiensis* subsp. *Aizawai* – *Bta*, visando o controle de *S. frugiperda*, obtiveram resultados bastante promissores para implementação destes em um sistema de controle de pragas, chegando a 100% de mortalidade das lagartas nos ensaios.

Batista et al. (2005), fizeram um estudo de prospecção de cepas de *B. thuringiensis* tóxicas a *S. frugiperda*, das 1375 cepas testadas apenas 26 causaram 100% de mortalidade, e destas apenas três passaram nos testes de dose, ou seja, mantinham a eficiência de mortalidade em baixas concentrações, sendo selecionadas como promissoras para produção de bioinseticidas no controle de *S. frugiperda*. Cepas bacterianas ou de suas formulações comerciais com capacidade de controlar *S. frugiperda*, com grande eficiência na mortalidade de insetos, requerem um estudo intenso. Os primeiros relatos realizados por Waquil et al. (1982) com *Bt* visando análises de testes de eficiência sobre artrópodes pragas não foram promissores, com resultados semelhantes ao do presente trabalho, quando comparam inseticidas químicos ao *Bt*, tendo os inseticidas químicos apresentando capacidade de causar mortalidade e de controlar a população de *S. frugiperda*, enquanto o inseticida biológico (*Bt*) não teve ação inseticida, similar a testemunha.

A utilização de *Bt* no controle de *S. frugiperda* é uma tecnologia já bem difundida nos dias atuais, tanto na produção de milho transgênico como na utilização de inseticidas formulados com base nessa bactéria. Porém estudos mostram que algumas populações de *S. frugiperda* já se mostram resistentes a essa bactéria, proveniente de uma seleção natural pelo uso abusivo desses inseticidas biológicos (JAKKA; KNIGHT; JURAT-FUENTES, 2014). Estudos em Porto Rico relataram a presença de populações de *S. frugiperda* resistentes à proteína Cry1F expressa no milho *Bt* (STORER et al., 2010). Em 2014, no Brasil observou-se também a evolução da resistência de *S. frugiperda* à proteína Cry1F (FARIAS et al., 2014). Tais relatos torna-se um grande incentivo a contínua pesquisa e procura de cepas bacterianas que tenham a capacidade de controlar esta praga afim de evitar aumento exponencial de populações resistentes.

Tabela 1. Mortalidade (%) e duração (média  $\pm$  erro padrão) de lagartas e pupas, razão sexual e efeito subletal sobre adultos faratos, quando lagartas de 3º instar de *S. frugiperda* foram submetidas a arenas foliares contaminadas com os tratamentos.

Tratamentos	População inicial dos tratamentos	Lagarta de 3º <sup>1</sup>			Pupa <sup>1</sup>		Emergência <sup>2</sup>			Adulto Farato	
		Mortalidade	Duração (Dias)	Nº de pupas	Mortalidade	Duração (Dias)	Nº Macho	Nº Fêmea	Razão sexual	Emergiu com asas atrofiadas	Não emergiu completamente
Controle positivo (Fenproprina)	16	8 (50%)	14 $\pm$ 0,65 a	8 (50%)	4 (25%)	8,3 $\pm$ 0,53 a	1 (6,25%)	3 (18,75%)	0,75*	0 (0%)	0 (0%)
Controle Negativo (Solução salina)	16	1 (6,25%)	10,7 $\pm$ 0,63 b	13 (81,25%)	5 (31,25%)	6,8 $\pm$ 0,75 a	2 (12,5%)	6 (37,5%)	0,75*	0 (0%)	0 (0%)
Sobrenadante da cultura	16	0 (0%)	12,2 $\pm$ 0,65 ab	16 (100%)	10 (62,5%)	7,7 $\pm$ 0,33 a	2 (12,5%)	4 (25%)	0,67	2 (12,5%)	0 (0%)
Cultura de células da cepa 358.1 (100%)	16	2 (12,5%)	13,4 $\pm$ 0,87 ab	14 (87,5%)	9 (56,25%)	8 $\pm$ 0,58 a	2 (12,5%)	2 (12,5%)	0,5	0 (0%)	1 (6,25%)
Cultura de células da cepa 358.1 (75%)	16	0 (0%)	12,4 $\pm$ 0,66 ab	14 (87,5%)	10 (62,5%)	7 $\pm$ 0,41 a	1 (6,25%)	3 (18,75%)	0,75*	0 (0%)	1 (6,25%)
Cultura de células da cepa 358.1 (50%)	16	2 (12,5%)	13,2 $\pm$ 0,71 ab	11 (68,75%)	7 (43,75%)	8 $\pm$ 0,41 a	3 (18,75%)	1 (6,25%)	0,25*	3 (18,75%)	0 (0%)

<sup>1</sup>Os valores seguidos pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Tukey no nível de significância de 0,05. <sup>2</sup>Valores seguidos por um \* nas colunas diferem estatisticamente da razão esperada de 1:1 pelo teste para proporções iguais de  $\chi^2$  no nível de significância de 0,05.

Outro aspecto relevante na pesquisa foi a baixa mortalidade ocasionada pela cultura de células da cepa 358.1 e do sobrenadante da cultura. Uma possibilidade dessa baixa eficiência de controle pode estar associada a capacidade destas lagartas diferenciarem os locais contaminados e não contaminados pela bactéria nas áreas foliares, diminuindo a taxa efetiva dos 16 cm<sup>2</sup> de áreas foliares tratadas em causar efeito sobre a sobrevivências das lagartas, relatos da capacidade dessa detecção dos insetos foram constatados por Schmutterer (1990). Considerando essa aptidão dos insetos de diferenciar as áreas foliares contaminadas ou não contaminadas, à aplicação dos tratamentos nas folhas pode ter interferido na baixa taxa de mortalidade, considerando que não foi efetuada na área foliar total.

Lima et al. (2010) ao avaliarem a bioatividade de formulados de nim e *Bt* sobre lagartas de *S. frugiperda*, variando a forma de aplicação de seus tratamentos, imersão ou pulverização das folhas, obtiveram resultados bastante expressivos, com os formulados de nim e com os formulado de *Bt*. Tanto a aplicação dos tratamentos por imersão das folhas como por pulverização prévia das folhas antes de oferta-las, as lagartas, promoveu um aumento do volume de calda por área foliar, garantindo que uma grande área foliar fosse contaminada pelos tratamentos analisados e conseqüentemente promoveu maior ingestão dos produtos testados. Apesar da imersão sugerir uma maior abrangência da área foliar pelos tratamentos utilizados e conseqüentemente maior ingestão do produto pelas lagartas, as maiores taxas de mortalidade relatadas pela imersão foram de 82,9% para o formulado de nim e de 75% para o formulado de *Bt*, sendo menores que as taxas de mortalidades observadas quando esses tratamentos foram pulverizados, que foi de 100% em ambos tratamentos. Tais resultados sugerem que a forma de aplicação de tratamentos no controle de insetos pragas, como lagartas do cartucho, está intimamente ligada a maior eficiência da ação inseticida dos compostos usados.

De acordo com a Tabela 1, a taxa de mortalidade na fase pupa foi maior nos tratamentos com cultura celular, variando de 43,75 a 62,5% de mortalidade e no sobrenadante da cultura com 62,5%, enquanto que o controle positivo (fenproprina) e negativo (solução salina) foram de 25% e 31, 25%, respectivamente. Os resultados obtidos para os tratamentos biológicos (cultura celular e sobrenadante da cultura) podem ser atribuídos aos efeitos nocivos na fisiologia da fase jovem desse inseto, ou seja, efeitos no processo de muda ou na metamorfose, ocasionando a morte na fase pupal, dados que se assemelham aos obtidos por Adel e Sehnal (2000) e Viana e Prates (2003).

A razão sexual observada foi significativa considerando a proporção de 1:1 (fêmeas/machos) para o controle positivo, negativo e cultura de células da cepa 358.1 (75%), para uma

razão maior de fêmeas e do tratamento cultura de células da cepa 358.1 (50%), para uma razão maior no número de machos (Tabela 1).

As diferenças das razões sexuais observadas podem ser provenientes da alimentação das lagartas das áreas contaminadas com os resíduos dos produtos analisados nas folhas, ocasionando efeito subletal, os quais são comuns entre populações de insetos alvos, ou não alvos nos campos de produção quando expostos aos resíduos de inseticidas (CROFT, 1990), onde a mortalidade nem sempre é alcançada, porém, efeitos subsequentes à fase exposta ao tratamento podem expressar danos morfofisiológicos.

Silva et al. (2016) observaram em seus estudos maior porcentagem de machos de *S. frugiperda* quando alimentadas com óleo de nim associado ao pós-inerte caulim, em folhas de tomateiro. Por outro lado, Waquil et al. (2016) ao alimentarem lagartas de *S. frugiperda* com milho *Bt* não obtiveram diferenças na razão sexual de suas populações. Variações e/ou aplicações de substâncias na dieta dessas lagartas podem alterar a razão sexual da população (PAROLIN, 2012; OLIVEIRA, 2015).

Dentre os efeitos deletérios e subletais observados entre os tratamentos analisados para o controle de *S. frugiperda*, a não emergência e a deformação morfológica das asas de alguns adultos mereceram atenção (Figura 9). Nos tratamentos com cultura celular da cepa 358.1 em sua concentração total e cultura celular diluída a 75%, em ambos os tratamentos, 6,25% dos adultos não conseguiram emergir completamente, ficando com parte do corpo preso à pupa. Já nos tratamentos com sobrenadante da cultura e cultura celular diluída (50%), dos adultos, 12,5% e 18,75%, respectivamente, apresentaram deformidades morfológicas nas asas (Figura 10). Tais resultados são semelhantes aos de Martinez e Van Emden (2001) quando analisaram lagartas de 3º instar de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae), porém, alimentadas com dieta artificial associadas a doses de azadiractina, um composto regulador de crescimento que interfere no sistema neuroendócrino dos insetos.

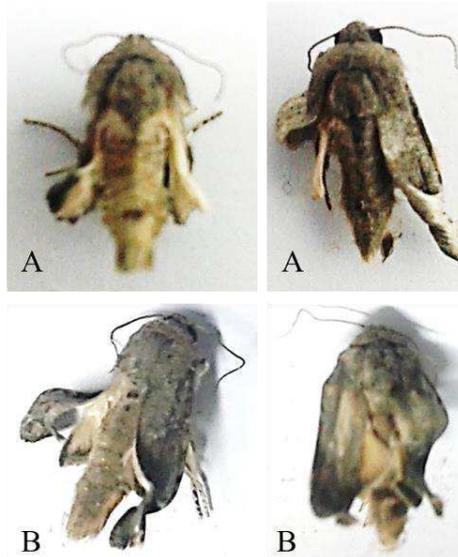


Figura 9. Danos morfológicos nas asas de adultos recém emergidos de *S. frugiperda* quando lagartas de 3º instar foram contaminadas ao sobrenadante da cultura (A) ou cultura de células da cepa 358.1 diluída a 50% (B).

Deformidades morfológicas atribuídas às substâncias ou metabólitos podem causar efeitos adversos nos hormônios do crescimento, como na ecdisona e hormônio juvenil (WIGGLESWORTH, 1972). Loeck et al. (2007) avaliaram inseticidas que podiam ser usados para alterar a metamorfose e promover deformidades morfológicas, atuando como um agonista aos ecdisteroides. Mais recentemente deformidades na fase adulta foram registradas por Modolon et al. (2016), quando aplicaram sais de sílica (*Silicea terra*) e um preparado homeopático na dieta de *S. frugiperda*. STORCH et al. (2002) avaliando efeitos de *B. thuringiensis*, observou efeitos deletérios na morfologia de adultos de *S. frugiperda*, afetando o desenvolvimento da progênie, promovendo deformação em asas e redução da fecundidade e viabilidade dos ovos.

Produtos biológico com capacidade de controlar insetos vêm sendo cada vez mais pesquisados, bactérias, fungos, vírus e extratos de plantas são os mais promissores (SOUZA, 2001; MARTINS et al., 2009; BARBOSA et al., 2011). Porém poucos trabalhos sobre a avaliação do efeito inseticida de metabólitos produzidos por bactérias, como os biossurfactantes, foram descritos para o controle de lepidópteras. Por outro lado, a atividade inseticida já foi descrita, o que pode explicar as maiores taxas de mortalidade ocasionadas no estágio de pupa de *S. frugiperda* (Tabela 1). Apesar de os testes de espalhamento do óleo terem mostrado uma baixa produção de biossurfactante, tais dados mostram a importância de estudos mais minuciosos sobre os efeitos dos metabólitos produzidos, presentes no

sobrenadante da cultura, por bactérias sobre artrópodes pragas (STANGHELLINI; MILLER, 1997; PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999; PARREIRA et al., 2013; AYER, 2014).

Como por exemplo, os estudos realizados por Khedher et al. (2017), que demonstraram a capacidade inseticida do biossurfactante produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* no controle de populações de *S. littoralis*.

#### 4.2.1.2. Toxicidade de cepa bacteriana 358.1 sobre arenas foliares previamente esterilizadas e em seguida fornecidas a lagartas de 3º instar de *S. frugiperda*

Quando lagartas de 3º instar de *S. frugiperda* foram acondicionadas em arenas foliares previamente esterilizadas e em seguida contaminadas com os tratamentos, as taxas de mortalidade foram baixas em todos os tratamentos analisados, tendo a única mortalidade (3,33%) nesse estágio de desenvolvimento para o tratamento representado pela cultura celular da cepa 358.1 (100%) (Tabela 2), inclusive o controle positivo também não teve efeito deletério sobre as lagartas nesse estágio. Tais resultados discordam dos obtidos por Barbosa et al. (2011) quando da avaliação da eficiência de inseticidas biológicos e naturais sobre o controle de *S. frugiperda* em condições de campo, nos quais, flubendiamida (BELT®) e *B. thuringiensis* foram os que mais se destacaram, com 92,5 e 75% de mortalidade, respectivamente 21 dias após aplicação dos tratamentos Storch et al. (2014), ao avaliarem efeitos subletais dos inseticidas Malationa e Lambdacialotrina, com aplicação tópica sobre lagartas de 3º instar de *S. frugiperda*, observaram a redução do percentual de ovos viáveis, porém não mostraram efeitos significativos na mortalidade das larvas quando foram aplicados.

A não eficiência de produtos sintéticos, como por exemplo a flubendiamida, utilizada na presente pesquisa, pode estar relacionada à seleção natural de populações da praga, submetidas a sucessivas pulverizações do produtos, expressando a resistência dessas populações, caso que tem sido frequente em estudos com *S. frugiperda* (RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001). A resistência de *S. frugiperda* já foi descrita para diversas classes de inseticidas, dentre os mecanismos de defesa utilizados pela praga contra os produtos químicos, a detoxificação por enzimas exerce um papel fundamental como mecanismo de defesa e resistência a xenobióticos, ativada quando há pressão de seleção com inseticidas (YU, 1991; FEYEREISEN, 2005; DOURADO, 2009).

Tabela 2. Mortalidade (%), duração (média  $\pm$  erro padrão), razão sexual e efeito subletal, quando lagartas do 3º instar de *S. frugiperda* foram acondicionadas em arenas foliares contaminadas com os tratamentos.

Tratamentos	População inicial dos tratamentos	Lagarta de 3º - 6º instar <sup>1</sup>			Pupa <sup>1</sup>		Emergência <sup>2</sup>			Adulto Farato	
		Mortalidade	Duração (Dias)	Nº de pupas	Mortalidade	Duração (Dias)	Nº Macho	Nº Fêmea	Razão sexual	Emergiu com asas atrofiadas	Não emergiu completamente
Controle positivo (flubendiamida)	30	0 (0%)	7,6 $\pm$ 0,31 ab	30 (100%)	3 (10%)	7,7 $\pm$ 0,17 a	12 (40%)	15 (50%)	0,55	1 (3,33%)	0 (0%)
Controle Negativo (Água destilada)	30	0 (0%)	6,97 $\pm$ 0,36 b	30 (100%)	0 (0%)	7,93 $\pm$ 0,17 a	16 (53,44%)	14 (46,66%)	0,46	1 (3,33%)	0 (0%)
Sobrenadante da cultura	30	0 (0%)	7,2 $\pm$ 0,38 ab	30 (100%)	3 (10%)	8 $\pm$ 0,16 a	11 (36,66%)	16 (53,33%)	0,59	3 (10%)	0 (0%)
Cultura de células da cepa 358.1 (100%)	30	1 (3,33%)	8,37 $\pm$ 0,45 a	27 (90%)	3 (10%)	8,2 $\pm$ 0,2 a	10 (33,33%)	13 (43,33%)	0,57	0 (0%)	0 (0%)

<sup>1</sup>Os valores seguidos pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Tukey no nível de significância de 0,05. <sup>2</sup>Valores seguidos por um \* nas colunas diferem estatisticamente da razão esperada de 1: 1 pelo teste para proporções iguais  $\chi^2$  no nível de significância de 0,05.

Apesar de o mecanismo de detoxificação por enzimas ser o mais comumente visto quando falamos de resistência de *S. frugiperda*, existem outras formas que não estão ligadas a esses mecanismos, como o descrito por Okuma (2015), que avaliou as bases de resistência de *S. frugiperda* a *spinosad* e relatou que a resistência ao *spinosad* não está ligada a detoxificação por meio de enzimas metabólicas.

Contrariando outros estudos que relataram análises de resistência e das baixas mortalidades observadas no presente estudo, resultados obtidos por Ribeiro (2014) com o inseticida flubendiamida, demonstraram suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* a inseticidas diamidas, que essa classe de inseticidas ainda não induziu resistência as lagartas de *S. frugiperda*. No entanto, é importante salientar que os efeitos dos produtos químicos, tais como os inseticidas, são intrínsecos à população em que esses estão sendo submetidos, que respostas de toxicidade podem ser diferentes, mesmo entre populações de mesma espécie, principalmente quando provenientes de regiões distintas (BLEICHER, 1985).

Os primeiros registros de resistência de *S. frugiperda* foram notados em 1965 na Bolívia para o composto metomil. Porém o primeiro caso constatado foi observado no estado da Flórida (EUA), com a resistência ao inseticida carbaril, por meio da detoxificação metabólica dessa espécie de inseto (YOUNG; McMILIAN, 1979). Já existem 42 casos de resistência de *S. frugiperda* para 19 moléculas de inseticidas pertencentes ao grupo de organofosforados (clorpirifós, diazinona, malationa, parationa-metálica e triclofom), piretroides (permetrina, ciflutrina, lambdacialotrina, cipermetrina, DDT, deltametrina, fenvalerato e fluvalinato), carbamatos (carbaril, metomil e tiodicarbe), antagonistas dos canais de cloro mediados pelo GABA (dieldrin, aldrin e HCH-gama), além de duas proteínas *Bt* (Cry1F, Cry1Ac) (ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE, 2014).

Uma estratégia que não seja bem elaborada na aplicação ou uso da tecnologia *Bt* pode induzir resistências nas populações de lagartas de *S. frugiperda*, dificultando assim seu controle. Sousa et al. (2016) avaliou a exposição da toxina *Bt* em baixas ou moderadas doses sobre a indução de resistência em populações de lagartas de *S. frugiperda* que não tiveram contato com o milho *Bt* e que tiveram, e mostrou que o gene de resistência pode ser passado para as próximas gerações, seja esta população de lagartas oriunda de uma alimentação ou área com milho *Bt* ou milho convencional.

CRUZ et al. (2014) trabalharam com formulado de *Bt*, óleos essenciais e suas combinações na avaliação de mortalidade e efeitos na biologia de lagartas de 3º instar de *S. frugiperda* quando estas submetidas a alimentação com folhas submersas nos tratamentos. Estes autores observaram um decaimento na população de lagartas quando estas foram tratadas com os óleos essenciais, porém

quando em combinação com *Bt* não promoveu aumento da mortalidade. Buscar combinações com diferentes produtos biológicos no controle de lagartas praga é uma opção para evitar indução de resistência por utilização abusiva de um só produto nas áreas, como ocorre comumente com os defensivos químicos.

Adotar uma melhor estratégia de controle para conter populações de *S. frugiperda* a ponto de não induzir resistência e conseguir um controle eficiente com os produtos aplicados é uma tarefa que exige grande empenho e pesquisa (CRUZ, 2002). O Manejo Integrado de Pragas (MIP) é uma ferramenta que engloba várias estratégias em conjunto buscando manter o controle de insetos pragas, sendo que o controle biológico com a utilização de microrganismos é uma das ferramentas mais estudadas no auxílio ao MIP. A procura de novas cepas bacterianas e metabólitos produzidos por essas, é uma maneira de contribuir para a diminuição e uso abusivo de inseticidas químicos, a indução de resistência e diminuir os impactos negativo causados nos agroecossistemas (MARTINS et al., 2009; BARBOSA et al., 2011; JUNIOR, 2011; WRIGHT, 2014; KHEDHER et al., 2017).

As lagartas contaminadas com a cultura celular da cepa 358.1 em sua concentração total levaram aproximadamente 8 dias para pupa, diferindo estatisticamente de todos os tratamentos (Tabela 2). Tais resultados, prolongamento da fase jovem, podem ser atribuídos à alterações na fisiologia do inseto após ingerir cepas da bactéria junto com a área foliar em que essas foram depositadas, ocasionando, possivelmente, menor ingestão de alimento, ineficiência de captura e assimilação de nutrientes, fatores indispensáveis para seu desenvolvimento, como relatados por Martinez e Van Emden (2001). Maroneze e Gallegos (2009), relataram aumento significativo na duração da fase larval para 25,7 dias lagartas de *S. frugiperda*, quando estas foram alimentadas com folhas de milho submersas em extrato aquoso de *Melia azedarach*.

#### 4.2.2. Toxicidade de cepa bacteriana 358.1 sobre arenas foliares previamente esterilizadas e em seguida fornecidas a lagartas de 2º instar de *S. frugiperda*

A maior mortalidade de *S. frugiperda* ocorreu quando flubendiamida foi depositada nas arenas de folhas e oferecidas às lagartas de 2º instar (Figura 10), com 12 mortes dos espécimes em 7 dias no máximo, seguido pelos tratamentos controle negativo e sobrenadante da cultura com 5 e 4 mortes, respectivamente, até o 6º dia de avaliação, e por último o tratamento cultura celular da cepa 358.1 com apenas 3 mortes sucedidas até 17º dia do início do ensaio, porém não houve diferença estatística entre os tratamentos em nenhum tempo avaliado.

A detecção de cepas promissoras para testes de mortalidade e insetos praga, como a *S. frugiperda*, é uma tarefa de grande importância para elaboração de novos produtos biológicos que

venham a ser utilizados como uma alternativa aos inseticidas químicos. Ana Rita et al. (2015) buscou selecionar cepas promissoras de *Bt* com capacidade para expressar as proteínas *Cry1Fa*, *Vip3Aa* e *Chi* que podem aumentar os efeitos tóxicos contra as lagartas de *S. frugiperda*, e dentre os 114 isolados apenas 10,53% continha todos os genes para expressar as três proteínas, mas as cepas que continham a combinação desses três genes tinham sua capacidade de inseticida aumentada de maneira significativa, chegando a mais de 94% de mortalidade quando testadas em lagartas de *S. frugiperda* neonatais (1º instar). Cerqueira et al. (2016) também buscaram cepas de *Bt* com alta capacidade inseticida. Em seu trabalho fez uma seleção e caracterização a partir de 3.384 cepas de *Bacillus*, e dentre estas, rastreou as que continham o gene *Cry*. Conseguindo assim encontrar quatro isolados com alta toxicidade e portadores do gene *Cry2* que apresentavam ação letal em lagartas neonatais de *S. frugiperda*. Tais resultados diferem dos obtidos no presente trabalho, uma vez que os valores de mortalidade com lagartas de 2º instar (Tabela 3) foram mais baixos que os obtidos por Ana Rita e colaboradores (2015), tal diferença pode ser atribuída a maior facilidade de controle da população de lagartas quando estas são recém eclodidas.

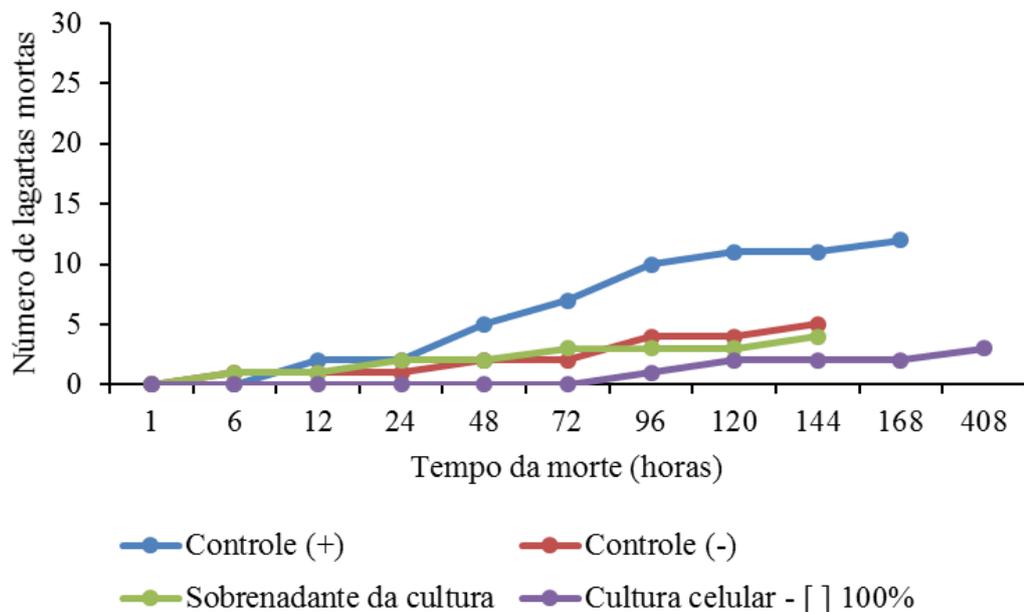


Figura 10. Curva de mortalidade acumulada de lagartas de 2º-6º instar, quando lagartas de 2º instar foram contaminadas com áreas foliares contendo os tratamentos. Flubendiamida (+) e água destilada (-).

Lima et al. (2010), ao testarem *Bt* e extrato de nim para o controle de lagartas de 1º e 3º instares de *S. frugiperda*, obtiveram resultados promissores, com altos índices de mortalidade, os quais chegaram a 100%, principalmente quando os insetos estavam no primeiro estágio (1º instar), salientando que as suscetibilidades a ação de inseticidas são menores a medida que o espécime alcança estádios mais avançados.

Essas informações corroboram com os ensaios realizados no presente estudo, uma vez que, o número de lagartas mortas foi maior nos tratamentos, quando estes foram aplicados em lagartas de 2º instar (Tabela 3) quando comparadas às mortalidades das lagartas de 3º instar citados anteriormente na Tabela 2. O prolongamento da fase jovem também foi observado, com média de aproximadamente de 20 dias, das lagartas contaminadas até a formação das pupas. Resultados que se assemelham aos obtidos por Santiago (2005), estudando a mortalidade de *S. frugiperda* alimentadas com dietas artificiais com adição de extratos de plantas.

Pode-se notar também uma maior prolongação na fase larval em lagartas tratadas no 2º instar para aproximadamente 20 dias, que é a soma da maior média de duração da fase larval mais 4 dias, que foi o tempo necessário para as lagartas atingirem este estágio e darem início ao experimento (Tabela 3), quando comparadas com lagartas tratadas no 3º instar que foi de aproximadamente 18 dias, que é a soma da maior média de duração da fase larval mais 9 dias, que foi duração para as lagartas atingirem o 3º instar e darem início ao experimento (Tabela 2). Prolongamentos da fase jovem podem ser atribuídos a um maior tempo de ingestão do produtos analisados e adicionados às dietas dos insetos, considerando que lagartas de 2º instar consumiram mais áreas foliares contaminadas que lagartas que já estejam em instares mais adiantados de desenvolvimento, ocasionando maior suscetibilidade das lagartas mais jovens, por diminuição na assimilação de nutrientes e conseqüentemente comprometimento do seu desenvolvimento (MARTINEZ; VAN EMDEN, 2001; SANTIAGO, 2005).

Tabela 3. Mortalidade (%), duração (média  $\pm$  erro padrão) de lagartas e pupas, razão sexual e efeitos subletais (adulto farato), quando lagartas do 2º instar de *S. frugiperda* foram contaminadas aos diferentes tratamentos.

Tratamentos	População inicial dos tratamentos	Lagarta de 2º - 6º instar <sup>1</sup>			Pupa <sup>1</sup>		Emergência <sup>2</sup>			Adulto Farato	
		Mortalidade	Duração (Dias)	Nº de pupas	Mortalidade	Duração (Dias)	Nº Macho	Nº Fêmea	Razão sexual	Emergiu com asas atrofiadas	Não emergiu completamente
Controle positivo (BELT® - Bayer)	30	12 (40%)	15,59 $\pm$ 0,45 a	17 (56,66%)	1 (3,33%)	8,27 $\pm$ 0,39 a	7 (23,33%)	8 (26,66%)	0,53	0 (0%)	0 (0%)
Controle Negativo (Água destilada)	30	5 (16,66%)	15,88 $\pm$ 0,39 a	25 (83,33%)	5 (16,66%)	8 $\pm$ 0,16 a	11 (36,66%)	9 (30%)	0,45	1 (3,33%)	0 (0%)
Sobrenadante da cultura	30	4 (13,33%)	14,92 $\pm$ 0,4 ab	24 (80%)	6 (20%)	7,94 $\pm$ 0,15 a	9 (30%)	9 (30%)	0,5	1 (3,33%)	0 (0%)
Cultura de células da cepa 358.1 (100%)	30	3 (10%)	14 $\pm$ 0,28 b	23 (76,66%)	2 (6,66%)	8,25 $\pm$ 0,14 a	11 (36,66%)	9 (30%)	0,45	2 (6,66%)	0 (0%)

<sup>1</sup>Os valores seguidos pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Tukey no nível de significância de 0,05. <sup>2</sup>Valores seguidos por um \* nas colunas diferem estatisticamente da razão esperada de 1: 1 pelo teste para proporções iguais  $\chi^2$  no nível de significância de 0,05.

A influência de produtos biológicos sobre a morfofisiologia de pragas na fase jovem pode contribuir muito com MIP, já que propicia um comprometimento na população de adultos, diminuindo às gerações subsequentes da praga, além de promover uma maior exposição da fase jovem à ação de inimigos naturais, como predadores, parasitóides e outros microrganismos entomopatogênicos.

Alterações morfológicas quando lagartas de 2º instar foram contaminadas, similares às identificadas no ensaio anterior, com lagartas de 3º instar, onde adultos emergiram com asas atrofiadas, como representados na Figura 11. O controle positivo flubendiamida não ocasionou essa anomalia, porém para os tratamentos, sobrenadante da cultura celular foi constatado 3,33% e para a cultura celular da cepa 358.1 em sua concentração total, 6,66% de adultos com asas atrofiadas. Diferindo desses resultados, Storch et al. (2014) não detectaram alterações morfológicas em apêndices torácicos de adultos, quando inseticidas em doses subletais foram aplicados sobre lagartas de *S. frugiperda*, no entanto, foi relatado por esses mesmos autores, redução da fertilidade.

Essas alterações morfológicas observadas ao longo dos ensaios são preponderantes sob o ponto de vista da biologia dessa praga, uma vez que, podem comprometer a capacidade de voo dos adultos, pela busca de alimentos e cópulas, e conseqüente levando a uma diminuição da população da praga nas gerações futuras.

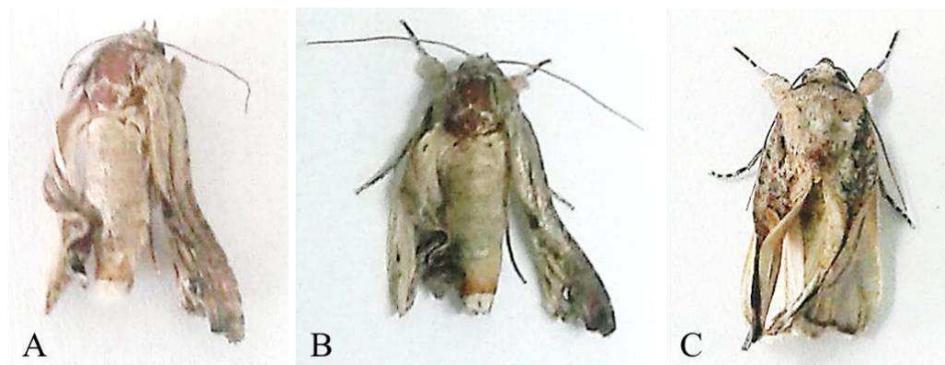


Figura 11. Deformidade morfológicas nas asas de adultos de *S. frugiperda* presentes nos tratamentos, Controle negativo (A) e Sobrenadante da cultura (B) e Cultura de células da cepa 358.1 na concentração total (C) no ensaio 2 com lagartas de 2º instar.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, novos experimentos devem ser incentivados visando a investigar a cepa bacteriana 358.1 e o sobrenadante da cultura em outras concentrações com diferentes técnicas de contaminação e estágios de desenvolvimento de *S. frugiperda*, bem como alterações subletais nas gerações subsequentes às contaminadas, como fertilidade e fecundidade de adultos.

## 5. CONCLUSÕES

A cepa bacteriana 358.1, isolada do petróleo, não mostrou eficiência de controlar lagartas de *Spodoptera frugiperda* no 2º e 3º. Os controles positivos utilizados nos testes não diferiram estatisticamente dos resultados obtidos com a cepa e com o sobrenadante da cultura. O único momento em que o controle positivo foi diferente estatisticamente dos outros tratamentos testados foi a fenpropatrina e somente no tempo 48h no ensaio 1. A cepa 358.1 e seu sobrenadante da cultura mostraram ação na fisiologia desse inseto, prolongando o tempo larval e interferindo na fisiologia do inseto no momento da sua metamorfose (fase de pupa) e na emergência dos adultos, com presença de asas atrofiadas. A baixa taxa de mortalidade em todos os tratamentos pode ter sido causada pelo desenvolvimento de resistência nas populações provenientes das pressões do uso sucessivo de inseticidas biológicos e químicos nas áreas em que foram coletados, o que nos leva promover ainda mais estudos na área da Biotecnologia, buscando novas estratégias de controle com base no controle biológico dentro do contexto do MIP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIMILHO (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DO MILHO). **Oferta e Demanda do Milho do Brasil**. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/estatistica>> 2014.
- ADEL, M.M.; SEHNAL, F. Azadirachtin potentiates the action of ecdysteroid agonist RH-2485 in *Spodoptera littoralis*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 46, p. 267-274, 2000.
- ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA, A. **Banco de Microrganismos Entomopatogênicos**. p. 30 - 33, 2001.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, New York, v. 59, n.1, p.143 - 169, 1995.
- ANA RITA, L.; SUZANA, C. M.; JULIANA, R. V. C.; ELIANE, C. C. A.; ODAIR, A. F.; MANOEL, V. F. L.; JANETE, A. D. Selection of strains from *Bacillus thuringiensis* genes containing effective in the control of *Spodoptera frugiperda*. **Bt Research**, 2015.
- ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**, 1994.
- ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE. **Michigan State University**. 2014. Disponível: <<http://www.pesticideresistance.com>>. Acesso em: 08 jan. 15.
- AYER, F. **Mosquito encurralado: detergente biológico combate o mosquito da dengue**. Disponível em: <[http://www.em.com.br/app/noticia/tecnologia/2014/08/09/interna\\_tecnologia,556758/mosquito-encurralado-detergente-biologico-combate-o-mosquito-da-dengue.shtml](http://www.em.com.br/app/noticia/tecnologia/2014/08/09/interna_tecnologia,556758/mosquito-encurralado-detergente-biologico-combate-o-mosquito-da-dengue.shtml)>, 2014.
- BARBOSA, R. H.; KASSAB, S. O.; FONSECA, P. R. B.; ROSSONI, C.; SILVA, A.S. Inseticidas biológico e natural no controle da *Spodoptera frugiperda* (JE SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho cultivado em condições de campo. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 6, n. 3, 2011.
- BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 996 - 1001, 2010.
- BATISTA, A.; MELATTI, V.; DEMO, C.; MARTIN, E.; PRAÇA, L.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; BROD, C.; MONNERAT, R. G. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Spodoptera frugiperda* (Screening of *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera frugiperda*). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 81, p. 19, 2005.

BLANCO, C.; CHIARAVALLE, W.; RIZZA, M. D.; FARIAS, J. R.; DEGANO, M. F. G.; GASTAMINZA, G.; SÁNCHEZ, D. M.; MURÚA, M. G.; OMOTO, C.; PIERALISI, B. K.; RODRÍGUES, J.; MARCIEL, J. C. R.; SANTOFIMIO, H. T.; VARGAS, A. P. T.; VALENCIA, S. J.; WILINK, E. Current situation of pests targeted by Bt crops in Latin America. **Current Opinion in Insect Science**, v. 15, p. 131 - 138, 2016.

BLEICHER, E. Biologia e exigências térmicas de populações de *Trichogramma* (Hym.: Trichogrammatidae). 1985. 80f. Tese (Doutorado em Entomologia) - ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1985.

BORTOLOTTI, O. C.; BUENO, A. F.; QUEIROZ, A. P.; SILVA, G. V. Larval development of *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* fed on fresh ear of field corn expressing the Bt proteins (Cry1F and Cry1F + Cry1A.105 + Cry2Ab2). **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 46, n. 11, p. 1898-1901, Nov. 2016. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782016001101898&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782016001101898&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 04 mar. 2017.

CERQUEIRA, F. B.; ALVES, G. B.; CORRÊA, R. F. T.; MARTINS, E. S.; BARBOSA, L. C. B.; NASCIMENTOM, I. R.; MONNERAT, R. G.; RIBEIRO, B. M.; AGUIAR, R.W. S. Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with a high insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bioscience Journal**, v. 32, n. 6, p. 1522 - 1535, 2016.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 1, n. 12, p. 127, 2014.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 3, n. 4, p. 154, 2016.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, v. 56, n. 8, p. 651 - 676, 2000.

COSTA, R. V.; COTA, L. V. Controle químico de doenças na cultura do milho: aspectos a serem considerados na tomada de decisão sobre aplicação. **Circular Técnica 125**, p. 11, Dezembro 2009.

CROFT, B.A. **Arthropod biological control agents and pesticides**. New York: Wiley-Interscience, p. 723, 1990.

CRUZ, F. A. B. **A importância do cultivo do milho na sustentabilidade do agronegócio**, 2013. Disponível em: [http://www.fundacaoba.com.br/pdf/a\\_importancia\\_do\\_cultivo\\_do\\_milho\\_na\\_sustentabilidade\\_do\\_agronegocio.pdf](http://www.fundacaoba.com.br/pdf/a_importancia_do_cultivo_do_milho_na_sustentabilidade_do_agronegocio.pdf) Acesso em 20 de maio, 2013.

CRUZ, G. S.; TEIXEIRA, W. V.; OLIVEIRA, J. V.; CORREIA, A. A.; BREDA, M. O.; ALVES, T, J. S.; CUNHA, F, M.; TEIXEIRA, A. A. C.; DUTRA, K. A.; NAVARRO, D. M. A. F. Bioactivity of *Piper hispidinervum* (Piperales: Piperaceae) and *Syzygium aromaticum* (Myrtales: Myrtaceae) Oils, With or Without Formulated *Bta* on the Biology and Immunology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 1, p. 144 - 153, 2014.

CRUZ, I. A LAGARTA-DO-CARTUCHO NA CULTURA DO MILHO. **Circular Técnica 21**, p. 45, 1995.

CRUZ, I. Influência do equipamento de aplicação e do estágio de desenvolvimento da planta na eficiência de inseticidas no controle de lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Sete Lagoas: **EMBRAPA, CNPMS**, p. 6, 1998.

CRUZ, I. Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith). **Embrapa Milho e Sorgo**, 2002.

CRUZ, I. Manejo integrado de pragas de milho com ênfase ao controle biológico. **Artigo em anais de congresso (ALICE)**. 1994. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/478707>>. Acesso em: 4 nov 2015.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; SILVA, R. B.; PENTEADO-DIAS, A. M. Ocorrência de parasitóides de *Spodoptera frugiperda* em áreas de produção de milho, em municípios de Minas Gerais. Resumos expandidos. In: **9º Congresso de Ecologia do Brasil**, São Lourenço, 2009.

CRUZ, I.; MONTEIRO, M. A. R. Controle Biológico da lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma*. **Comunicado técnico 114**, 2004.

CRUZ, I.; VALICENTE, F. H.; SANTOS, J. P.; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A. Manual de identificação de pragas da cultura do milho. Sete Lagoas: **EMBRAPA-CNPMS**, 1997.

DOURADO, P. M. Resistência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a spinosad no Brasil. Piracicaba: **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, 2009.

FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 64, p. 150 - 158, 2014.

FARINELLI, R.; FORNASIERI FILHO, D. Avaliação de dano de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivares de milho. **Científica**, v. 34, n. 2, p. 197 - 202, 2006.

FERREIRA FILHO, J.; ALVES, L.; GOTTARDO, L. C. B.; GEORGINO, M. Dimensionamento do custo econômico representado por *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho no Brasil. **48º Congresso da sociedade brasileira de economia, administração e sociologia rural**. Campo Grande, MS: 2010 Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/15/1168.pdf>>. Acesso em: 21 out. 2014

FERNANDES, T. C. C. **Investigação dos efeitos tóxicos do biossurfactante ramnolipídio e suas implicações quando usado na biorremediação de águas contaminadas por petróleo.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - RIO CLARO: Universidade Estadual Paulista, 2011.

FERREIRA, C. M. O. **Produção de compostos tensoativos por micro-organismos isolados de amostras de petróleo.** 2013. 45 f. Monografia - Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró - RN, 2013.

FERREIRA, D. F. *Sisvar* - sistema de análise de variância para dados balanceados. Lavras: UFLA, p. 19, 1998.

FEYEREISEN R. Insect cytochrome P450. In: Gilbert LI, editor. *Comprehensive Molecular Insect Science – Biochemistry and Molecular Biology*, v. 4, p. 1 - 77, 2005.

FIGUEIREDO, M. L. C. **Interação de inseticidas e controle biológico natural na redução dos danos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: noctuidae) na cultura do milho (*Zea mays*).** Tese (Doutorado) - SÃO CARLOS – SP: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, 2001.

FIGUEIREDO, M. DE L. C.; MARTINS-DIAS, A. M. P.; CRUZ, I. Relação entre a lagarta-do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1693 - 1698, 2006.

FIUZA, L. M.; SCHÜNEMANN, R.; PINTO, L. M. N.; ZANETTINI, M. H. B. Two new Brazilian isolates of *Bacillus thuringiensis* toxic to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 2, p. 363 - 369, 2012.

GIOLO, F.; GRUTZMACHER, A.; GARCIA, M.; BUSATO, G. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 8, n. 3, 2002.

GOMES, J. M. **Avaliação do potencial tensoativo da linhagem bacteriana 358.1 isolada do petróleo.** Monografia - Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró - RN, 2014.

JAKKA, S. R. K.; KNIGHT, V. R.; JURAT-FUENTES, J. L. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) with field-evolved resistance to Bt maize are susceptible to Bt pesticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 122, p. 52 - 54, 2014.

JUNIOR, M. E. Controle biológico de insetos pragas. **Seminário Mosaico Ambiental**, n. 1, 2011.

KHEDHER, S. B.; BOUKEDI, H.; DAMMAK, M.; FEKI, O. K.; BOUDAWARA, T. S.; MESRATI, L. A.; TOUNSI, S. Combinatorial effect of *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant and *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin on *Spodoptera littoralis* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 144, p. 11 - 17, 2017.

LIMA, M. P. L.; DE OLIVEIRA, J. V.; MARQUES, E. J. Manejo da lagarta-do-cartucho em milho com formulações de nim e *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1215 - 1218, 2009.

LIMA, M. P. L.; OLIVEIRA, J. M. G. C.; MARQUES, E. J.; CORREIA, A. A. Bioactivity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss, 1797) and *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai formulations in larvae of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 6, p. 1381 - 1389, 2010.

LOECK, A. E.; STORCH, G. BORBA, R.; MAGANO, D.; MORAIS, C.; GRUTZMACHER, A. Efeito de inseticidas aplicados em doses subletais sobre a dieta artificial e em lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Current Agricultural Science and Technology**, v. 13, n. 2, 2007.

MARONEZE, D. M.; GALLEGOS, D. M. N. Efeito de extrato aquoso de *Melia azedarach* no desenvolvimento das fases imatura e reprodutiva de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 3, p. 537 - 549, 2009.

MARTINEZ, S. S.; VAN EMDEN, H. F. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 113 - 125, 2001.

MARTINS, G. M.; TOSCANO, L. C.; TOMQUELSKI, G. V.; MARUYAMA, W. I. Inseticidas químicos e microbianos no controle da lagarta-do-cartucho na fase inicial da cultura do milho. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 2, 2009.

MORÁN, A. C.; OLIVEIRA, N.; COMMENDATORE, M.; ESTEVES, J. L.; SINERIZ F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. **Biodegradation**, v. 11, p. 65 - 71 2000.

MODOLON, T. A.; ALVES, L. F. A.; PIETROWSKI, V.; GUIMARÃES, A. T. B.; MARCIO, J. F. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho tratado com preparados homeopáticos. **Cadernos de Agroecologia**, v. 10, n. 3, 2016.

MOINO JR., A.; ALVES, S. B. Determination of dosages of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. for stored grain pests control. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 1, p. 15 - 20, abr. 1997.

MORAES, A. R. A.; LOURENÇÃO, A. L.; GUIDETTI, M. E. A. Z.; GALLO, P. B.; DUARTE, A. P. Avaliação da Produtividade e dos Danos Causados por *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) em Híbridos de Milho Convencionais e Transgênicos no Estado de São Paulo. In: **XXIX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO**. Águas de Lindóia, SP: 2012

OKUMA, D. M. **Bases genéticas e moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a spinosad**. Dissertação (Mestrado em Entomologia). Piracicaba - SP: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, 2015.

OLIVEIRA, A. A. S. **Biologia de *Spodoptera frugiperda* (SMITH) Lepidoptera: Noctuidae em milho doce tratado com fosfito de potássio.** Monografia - Brasília, DF: Universidade de Brasília (UnB), 2015.

PAROLIN, F. J. T. **ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) EM MILHO SOB EFEITO DE SILÍCIO, ÁCIDO GIBERÉLICO GA3 E HERBIVORIA PRÉVIA.** Dissertação (Mestrado em Agronomia/Entomologia) LAVRAS – MG: Universidade Federal de Lavras (UFLA), 2012.

PARREIRA, A. G.; RACHID, M. B.; MANSO, D. T. G.; ALVES, S. N.; CASTRO, A. A. P. O.; SANTOS, G.; ASSIS, G.; SILVA, B. A. B.; TOLOTA, M. R. Avaliação do efeito de surfactantes biológicos e sintéticos sobre larvas, pupas e insetos adultos de *Culex* sp. e *Aedes aegypti*. **27º Congresso Brasileiro de Microbiologia.** Natal – RN, set, 2013. Disponível em: <<http://www.sbmicrobiologia.org.br/cd27cbm/resumos/R1265-1.html>>. Acesso em: 29 out. 2014.

PAVÃO, A. R.; FERREIRA FILHO, J. B. DE S. Impactos econômicos da introdução do milho Bt11 no Brasil: uma abordagem de equilíbrio geral inter-regional. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 49, n. 1, p. 81 - 108, 2011.

PEREIRA, J. F. B.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A. P.; RODRIGUES, L. R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Pesticide Biochemistry and Physiology Fuel**, v. 111, p. 259 - 268, 2013.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 5, p. 553 - 563, 1999.

POMARI, A. F. **Parasitismo de *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae) em ovos de *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: noctuidae). Pragas de algodão, milho e soja.** (Dissertação) Universidade Estadual de Londrina, 2013.

POGUE, M. G. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society**, v. 43, p. 1 - 202, 2002.

PRAÇA, L. B.; NETO, S. P. DA S.; MONNERAT, R. G. *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) Biologia, amostragem e métodos de controle. documentos 199 - **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p. 23, 2006.

RIBEIRO, R. S. **Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil.** Dissertação (Mestrado em Ciências) - Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2014.

RODRÍGUEZ, G. I. D.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 311–316, 2001. Disponível em: <<http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146%2Fannurev.en.35.010190.001415>>. Doi: 10.1146/ annurev.en.35.010190.001415. 2001. Acesso em: 10 fev. 2017.

ROMEIRO, R. S. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Disciplina FIP- 640. **Bactérias Fitopatogênicas, Roteiro das aulas práticas, Aula 08 Unidade 09 Técnica da microgota.** 2007.

SANTIAGO, G. P. **Avaliação dos efeitos de extratos aquosos de plantas sobre a biologia da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) mantida em dieta artificial.** Dissertação (Mestrado em Agronomia) - TERESINA: Universidade Federal do Piauí, 2005.

SAR, N.; ROSENBERG, E. Emulsifier Production by *Acinetobacter calcoaceticus* Strains. **Current Microbiology**, v. 9, p. 309 - 314, 1983.

SAS - Statistical Analysis System. **SAS user's guide for windows environment.** 6.11 ed. Cary : SAS Institute, 1995.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.35, p. 271 - 297, 1990.

SILVA, A. A.; ALVARENGA, R.; MORAES, J. C.; ALCANTARA, E. Biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em Algodoeiro de Fibra Colorida Tratado com Silício. **EntomoBrasilis**, v. 7, n. 1, p. 65 - 68, 2014.

SILVA R. R. **Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil.** Dissertação (Mestrado em Ciências) - Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, 2014.

SILVA, K. C. C.; ZORZETTE, J.; SANTORO, P. H.; HOSHINO, A. T.; NEVES, P. M. O. J. Inert powders alone or in combination with neem oil for controlling *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 1801, 2016.

SILVEIRA NETO, S., NAKANO, O.; BARBIN, D.; VILLA NOVA, N.A. **Manual de ecologia dos insetos.** Piracicaba: Ceres, p. 419, 1976.

SILVEIRA, L. C.; VENDRAMIM, J. D.; ROSSETTO, C. J. Efeito de genótipos de milho no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 2, p. 291 - 298, 1997.

SMITH, J. E. The natural history of the rarer lepidopterous insects of Georgia. **Journal of Entomologist**, p. 191, 1797.

SOUZA, M. L. Utilização de microrganismos na Agricultura. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 21, p. 28 - 31, 2001.

SOUSA, F. F.; MENDES, S. M.; AMAYA, O. F. S.; OLIVEIRA, E. E.; PEREIRA, E. J. G.; LUTHER, D. S. Life-History Traits of *Spodoptera frugiperda* Populations Exposed to Low-Dose *Bt* Maize. **PLOS ONE**, v. 11, n. 5, p.1 - 19, 2016.

STANGHELLINI, M. E.; MILLER, R. M. Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plant disease**, v. 81, n. 1, p. 4 - 12, 1997.

STORCH, G.; LOECK, A. E.; COSTA, M. A. G.; GARCIA, M.S. Efeito de dois inseticidas sobre o desenvolvimento e progênie de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) sobreviventes a aplicação em lavoura comercial de milho. In: Anais da 1ª Mostra de iniciação científica e 1ª Jornada de pós-graduação, pesquisa e extensão. Bagé 2002, **Resumos**. URCAMP, p. 217, 2002.

STORCH, G.; LOECK, A. E.; REMOR, M.; PELOIA, P. Efeitos Subletais de Inseticidas sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), Utilizados na Cultura do Milho. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 13, n. 1, p. 71 - 79, 2014.

STORER, N.P.; BABCOCK, J.M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G.D.; BING, J. W.; HUCKABA, R.M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE). **World Corn Production, Consumption, and Stocks**. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=World+Corn+Production%2c+Consumption%2c+and+Stocks&hidReportRetrievalID=459&hidReportRetrievalTemplateID=7>>. 2014.

VIANA, C. L. T. P.; BORTOLI, S. A.; THULER, R. T.; GOULART, R. M.; THULLER, A. M. G.; LEMOS, M. V. F.; FERRAUDO, A. S. Efeito de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner em *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae). **Científica**, v. 37, n. 1, p. 22–31, 2009.

VIANA, P. A.; CRUZ, I.; WAQUIL, J. M., Cultivo do milho. **Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de Produção**, 1 ISSN 1679-012 Versão Eletrônica, n. 2, 2006.

VIANA, P. A.; PRATES, H. T. Desenvolvimento e mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* em folhas de milho tratadas com extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica*. Embrapa Milho e Sorgo. **Bragantina**, v. 62, n. 1, p. 69 - 74, 2003.

WAQUIL, M. S. et al. Índice de adaptação e tempo letal da lagarta-do-cartucho em milho Bt. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 563 - 570, 2016.

WAQUIL, O. M.; VIANA, P. A.; LORDELLO, A. I.; CRUZ, I.; OLIVEIRA, A. C. Controle da lagarta-do-cartucho em milho com inseticidas químicos e biológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 163 - 166, 1982.

WAQUIL, J.M.; VILELLA, F.M.F. Gene bom. **Revista Cultivar**, n. 49, p. 22 - 26, 2003

WIGGLESWORTH, V.B. The principles of insects physiology. **Jonh Wiley**, New York, , v 7, p. 827, 1972.

WRIGHT, M. G. Chapter 14 - Biological Control of Invasive Insect Pests. In: ABROL, D. P. (Ed.). **Integrated Pest Management**. San Diego: Academic Press, p. 267 - 28, 2014.

YIN, H. QIANG, J.; JIA, Y.; YE, J.; PENG, H., QIN, H.; ZHANG, N.; HE, B. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 302 - 308, 2009.

YOUNG, J. R.; MCMILLIAN, W. W. Differential feeding by two strains of fall armyworm larvae on carbaryl surfaces. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, Lanham, v. 72, p. 202 - 204, 1979.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MCLNERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactants production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 339 - 374, 2004.

YU, S. J. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 39, n. 1, p. 84 - 91, 1991.

ZENKER, M. M.; SPECHT, A.; CORSEUIL, E. Estágios imaturos de *Spodoptera cosmoniodes* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 24, n.1, p. 99 - 107, 2007.

ZUCCHI, R.A.; SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O. **Guia de identificação de pragas agrícolas**. São Paulo: Fealq, p. 139, 1993.