



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS**

**PATOGENICIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS  
DE NIM À *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**

**ERIKSEN PATRIC SILVA SOARES**

**2013**

**ERIKSEN PATRIC SILVA SOARES**

**Patogenicidade de bactérias isoladas de nim à *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de “*Magister Science*”.

**Orientadora**  
**Profa. Dra. Clarice Diniz Alvarenga Corsato**

**JANAÚBA**  
**MINAS GERAIS - BRASIL**  
**2013**

Soares, Eriksen Patric Silva.

S676p Patogenicidade de bactérias isoladas de nim à *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) [manuscrito] / Eriksen Patric Silva Soares. – 2013.

66 p.

Dissertação (mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, Universidade Estadual de Montes Claros-Janaúba, 2013.

ERIKSEN PATRIC SILVA SOARES

**Patogenicidade de bactérias isoladas de nim à *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de “*Magister Science*”.

**APROVADO em 27 de setembro de 2013.**

---

Profª. Dra. Clarice Diniz Alvarenga  
Corsato  
UNIMONTES  
(Orientadora)

---

Profª. Dra. Teresinha Augusta  
Giustolin  
UNIMONTES  
(Coorientadora)

---

Profª. Dra. Adélica Aparecida  
Xavier  
UNIMONTES

---

Prof. Dr. Renildo Ismael Félix Costa  
IFNMG – Januária/MG

JANAÚBA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2013

A Deus, único e verdadeiro motivo de  
estarmos vivos.

**Dedico**

Aos meus pais, Nilson e Guiomar, fonte  
superabundante de amor e carinho;

Aos meus irmãos, Heberth, Erika e  
Thiago;

A minha sobrinha, Valentina;

A minha namorada, fonte inesgotável de  
amor.

**Ofereço.**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, que me deu o Dom da vida, em quem muito acredito e tenho fé, por sempre me iluminar, proteger e guiar os meus passos.

À Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES, *Campus* de Janaúba-MG, pelo Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, pela possibilidade de estudar e desenvolver meus experimentos.

À CAPES - Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Teresinha Augusta Giustolin, que com paciência, dedicação, sabedoria e confiança, me deu a oportunidade de desenvolver este trabalho. Além da orientação e das correções me ajudou a ser um profissional qualificado através da Pós-Graduação. Por ser exemplo de pessoa e competência. Agradeço também o apoio e a compreensão. Serei eternamente grato!

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Clarice Diniz Alvarenga Corsato, por estar sempre presente ajudando. Por ser, juntamente com a Prof<sup>ª</sup>. Teresinha, referência de profissionalismo e conduta.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Adélica Aparecida Xavier, pela disponibilização dos isolados, pelos ensinamentos, participação na banca de defesa, pela confiança e disposição em sempre ajudar.

Ao Prof. Dr. Renildo Ismael Félix Costa, pela participação na banca examinadora, e toda contribuição fornecida.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, pelos conhecimentos transmitidos que direcionaram os meus passos.

A todos os funcionários da UNIMONTES, especialmente as responsáveis pela limpeza, Laine e Tânia, e também pelos responsáveis pela manutenção, Adelino e Joilton, e a todos os porteiros e funcionários da MGS/UNIMONTES.

Aos amigos do Laboratório de Entomologia da UNIMONTES, pela alegria e convivência harmoniosa, em especial a Amanda, Angra e Vaniane, por toda ajuda na execução dos experimentos; a Edna, Maria, Heryka e Zenóbia, por estarem sempre dispostas a ajudar.

As minhas amigas Cris e Heliselle, exemplos de pessoas, meus especiais agradecimentos, pelo auxílio, pela disposição em ajudar e por terem me recebido de braços abertos no Laboratório de Entomologia! Ao Irton, um amigo para a vida toda. Agradeço pela disposição em ajudar e pela boa companhia no mestrado e, tantos outros momentos.

Aos meus amigos de mestrado, Heliselle, Maria, Cris, Heryka, Martielle, Dafine, Franciele, Edna, Néia, Bruna Antunes, Fernanda, Hugo Thiago, Valdinei, Moacir, Artenis, Dario, Maione, Gilberto, Roberta, Ângela, Maria Helena, por terem contribuído para que a jornada do mestrado se tornasse mais prazerosa.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia, por me receberam de braços abertos e me auxiliarem, em especial a Maione e Gleika.

Aos colegas de república, Eurico Neto e Vinícius Diniz, por fazerem os meus dias quentes em Janaúba-MG mais serenos e divertidos. E aos amigos César Aquino e Raphael Moura.

À toda minha família, pelo incentivo e carinho, em especial a meus afilhados Karollayne, Thiago e Valentina. Agradeço por terem compreendido minha ausência e pela alegria compartilhada a cada reencontro.

Aos meus pais, Nilson e Guiomar, juntamente com meus irmãos, Heberth, Erika e Thiago e, minha sobrinha Valentina, que são os bens mais preciosos que Deus me presenteou. Agradeço por me apoiarem e sempre confiarem em mim, dando amor, estímulo e força, sem os quais eu não teria conseguido.

A minha namorada, Darlaine, um exemplo de pessoa, uma fonte inesgotável de amor, compreensão e incentivo. É uma namorada espetacular, amiga, companheira, fazendo com que a minha passagem por Janaúba-MG se tornasse mais prazerosa e agradável. Agradeço a ela por fazer parte da minha vida e por me completar, sendo a minha metade mais serena. E ainda por me auxiliar em várias partes dos experimentos, principalmente, nos finais de semana. Sempre serei muito grato! E à família da Darlaine, que se tornou minha segunda família, me acolhendo de braços abertos, e pelos momentos de descontração.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho, sendo minha segunda família na cidade de Janaúba-MG.

**O MEU MUITO OBRIGADO!**

Não se contente em trilhar um caminho estabelecido. Ao contrário, vá para onde não há caminho algum e deixe seu rastro.  
**(Johnnie Walker)**



## SUMÁRIO

RESUMO .....	I
ABSTRACT .....	III
1. INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1 <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> .....	4
2.1.1 DESCRIÇÃO, BIOLOGIA E HÁBITO ALIMENTAR.....	4
2.1.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA .....	6
2.1.3 CONTROLE .....	9
2.1.4 CONTROLE MICROBIANO .....	11
2.1.5 EFEITO INSETICIDA DE NIM.....	13
2.2 MICRORGANISMOS ASSOCIADOS ÀS PLANTAS .....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 OBTENÇÃO DE <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> .....	19
3.2 CULTIVO DO MILHO.....	20
3.3 MULTIPLICAÇÃO E PREPARO DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS .....	21
3.4 PATOGENICIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE <i>AZADIRACHTA INDICA</i> A LAGARTAS <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> .....	22
3.4.1 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE <i>AZADIRACHTA INDICA</i> .....	23
3.5 VIRULÊNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE <i>AZADIRACHTA INDICA</i> SOBRE LAGARTAS DE <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> .....	24
3.5.1 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE <i>AZADIRACHTA INDICA</i> .....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
4.1 PATOGENICIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE <i>AZADIRACHTA INDICA</i> SOBRE LAGARTAS <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> .....	27

<b>4.2 VIRULÊNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE <i>AZADIRACHTA</i> <i>INDICA</i> SOBRE LAGARTAS DE <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Duração e mortalidade larval e pupal de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas com suspensões de bactérias isoladas de plantas de nim, *Azadirachta indica* (continua).....31
- TABELA 2.** Peso de pupas macho e fêmea, deformação de adultos e adultos viáveis de *Spodoptera frugiperda*, provenientes de lagartas alimentadas com folhas de milho tratadas com suspensões bacterianas isoladas de plantas de nim, *Azadirachta indica* (continua). .....36
- TABELA 3.** Unidades formadoras de colônias (UFC) e variáveis biológicas de *Spodoptera frugiperda* avaliadas após a ingestão pelas lagartas de folhas de milho tratadas com suspensão bacteriana isoladas de plantas de nim, *Azadirachta indica* (continua). .....41
- TABELA 4.** Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) obtidas a partir de suspensões bacterianas isoladas de plantas de nim, *Azadirachta indica* ajustadas para 0,6 e 0,8 de absorvância .....43

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Mortalidade larval (%) e pupal (%) de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas com suspensões bacterianas isoladas de plantas de nim, *Azadirachta indica*.....44
- FIGURA 2.** Duração larval (dias) e pupal (dias) de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas com suspensões bacterianas isoladas de plantas de nim, *Azadirachta indica*.....45
- FIGURA 3.** Deformação de pupas (%) e adultos (%) de *Spodoptera frugiperda*, provenientes de lagartas alimentadas com folhas de milho tratadas com suspensões bacterianas isoladas de plantas de nim, *Azadirachta indica*.....46
- FIGURA 4.** Porcentagem de adultos viáveis de *Spodoptera frugiperda*, provenientes de lagartas alimentadas com folhas de milho tratadas com suspensões bacterianas isoladas de plantas de nim, *Azadirachta indica*.....47

## RESUMO

SOARES, Eriksen Patric Silva. **Patogenicidade de bactérias isoladas de nim à *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**. 2013. 82 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.<sup>1</sup>

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith), é considerada um inseto praga de grande importância econômica para a agricultura, devido aos danos causados e ao surgimento de populações resistentes a defensivos agrícolas. Visando contornar esses problemas, este trabalho teve como objetivo avaliar a patogenicidade de microrganismos isolados da planta nim, *Azadirachta indica* A. Juss, sobre a biologia de *S. frugiperda*. Foram avaliados 33 isolados bacterianos, obtidos a partir de extratos fermentados de nim (Nim), da superfície das folhas (epifíticos - Epi) e do mesófilo (endofíticos - Endo). As suspensões bacterianas foram preparadas a partir da adição de 10 mL de uma solução de NaCl (0,85 %) estéril que foram homogeneizadas e levadas ao espectrofotômetro para serem ajustadas para absorvâncias 0,6 ou 0,8 em densidade óptica de 540 nm, dependendo do experimento avaliado. Essas suspensões foram utilizadas para tratar através da imersão de pedaços de folhas do cartucho do milho. Esses pedaços de folha foram secos ao ar livre e transferidos para tubos de vidro, juntamente com uma lagarta de *S. frugiperda* com 10 dias de idade. As lagartas da testemunha receberam folhas de milho não tratadas. Foram avaliadas a duração e mortalidade larval e pupal, peso de pupas

---

<sup>1</sup> **Comitê de Orientação:** Profa. Dra. Clarice Diniz Alvarenga Corsato – UNIMONTES (Orientadora); Profa. Dra. Teresinha Augusta Giustolin (Coorientadora).

macho e fêmea e deformação de pupas e adultos e a porcentagem de adultos viáveis. Foram avaliadas ainda, as unidades formadoras de colônias (UFC) de cada um dos isolados avaliados em suspensões calibradas em espectrofotômetro para 0,6 e 0,8 de absorbância. A ingestão dos isolados bacterianos por lagartas de *S. frugiperda* com 10 dias de idade provocaram aumento na duração e mortalidade da fase larval, aumento na duração e mortalidade de pupas, redução nos pesos de pupas machos e fêmeas, aumento na deformação de adultos e redução na porcentagem de adultos viáveis. Foram encontrados 11 isolados que provocaram aumento na duração da fase larval de *S. frugiperda* e 10 que aumentaram a mortalidade desta fase. Para a fase de pupas, foram encontrados 19 isolados que aumentaram a duração, 14 que aumentaram a mortalidade, 23 que reduziram o peso de pupas macho e 19 o peso de pupas fêmea. Para a fase adulta, 13 foram os isolados provocaram aumento na porcentagem de deformação e 12 isolados que reduziram a porcentagem de adultos viáveis. A ingestão dos isolados Endo 01 e Epi 14 não afetaram nenhuma fase do inseto. Assim, conclui-se que todos os isolados avaliados foram patogênicos a *S. frugiperda* à exceção do Endo 01 e Epi 14.

## ABSTRACT

SOARES, Eriksen Patric Silva. **Pathogenicity of bacteria isolated from the neem to *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**. 2013. 82 p. Dissertation (Master's degree in Plant Production in the Semiarid)- Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.<sup>2</sup>

The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith) is considered an insect-pest of great economic importance for agriculture, due to damage and to emergence of resistant populations to pesticides. In order to avoid these problems, this study aimed to evaluate the pathogenicity of microorganisms isolated from the neem, *Azadirachta indica* A. Juss plant, on the biology of *S. frugiperda*. We evaluated 33 bacterial isolates, obtained from fermented extracts of neem (Nim), from the surface of the leaves (epiphytics - Epi) and mesophyll (endophytics - Endo). The bacterial suspensions were prepared from the addition of 10 ml of a solution of sterile NaCl (0.85 %), that were homogenized and taken to spectrophotometer to be adjusted to absorbance 0.6 or 0.8 in optical density 540 nm depending on the evaluated experiment. These suspensions were used to treat by immersing the pieces of maize leaves. These pieces of leaf were air-dried and transferred to glass tubes, together with a *S. frugiperda* caterpillar 10 days old. The caterpillars of control received maize leaves without treatment. We assessed the duration and mortality of larvae and pupae, weight of male and female pupae and deformation of pupae and adults, and the percentage of viable adults. They were assessed the colony forming units (UFC) of each one of the

---

<sup>2</sup> **Guidance Committee:** Prof. Dr. Clarice Diniz Alvarenga Corsato – UNIMONTES (Adviser); Prof. Dr. Teresinha Augusta Giustolin (Co-adviser).

isolates evaluated in suspensions calibrated in spectrophotometer for 0.6 or 0.8 of absorbance. The ingestion of bacterial isolates by *S. frugiperda* caterpillars 10 days old have increased duration and mortality of larval phase, duration and pupae mortality; decreased weights of males and females pupae, increased adult deformation, and reduced percentage of viable adult.. We found 11 isolates that increased duration of the larval stage of *S. frugiperda*, and 10 which increased the mortality of that phase. For pupae stage, we found 19 isolates that increased the duration, 14 which increased mortality, 23 which reduced weight of male pupae and 19 which decreased weight of female pupae. To adulthood, 13 isolates were increased percentage of deformation and 12 ones that reduced the percentage of viable adults. The intake of isolates Endo 01 e Epi 14 did not affect any stage of the insect. Thus, it is concluded that all of the isolates were pathogenic to *S. frugiperda* except for Endo 01 e Epi 14.



## 1. INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), é uma espécie polífaga considerada praga de diversas culturas de importância econômica (CRUZ, 1995; PRAÇA *et al.*, 2006). No Brasil é praga-chave do milho, devido à sua ocorrência generalizada e o seu potencial de ataque (GALLO *et al.*, 2002; PRADO *et al.*, 2004).

O controle de *S. frugiperda* em campo tem sido feito, principalmente, através do uso de inseticidas químicos (GASSEN, 1996; GRÜTZMACHER *et al.*, 2000; VALICENTE e FONSECA, 2004). Apesar de eficientes, esses produtos agrícolas apresentam desvantagens como a contaminação ambiental, os resíduos nos alimentos, os desequilíbrios biológicos devido à eliminação de inimigos naturais e o surgimento de populações de insetos resistentes (HERNÁNDEZ e VENDRAMIM, 1996). As populações resistentes têm levado à redução na eficiência de controle dos produtos químicos (CRUZ *et al.*, 2008; DIEZ-RODRIGUES e OMOTO, 2001; OMOTO *et al.*, 2000; MACHADO e FÍUZA, 2009).

Uma forma de contornar os problemas causados pelo uso exclusivo de inseticidas para o controle de *S. frugiperda* seria o uso de inseticidas botânicos. Esse é um método alternativo de controle de insetos-praga que tem vantagens como: ser rapidamente degradado, ter baixa toxicidade aos mamíferos, ser seletivo aos inimigos naturais e ter baixa fitotoxicidade (MOREIRA *et al.*, 2005), proporcionando, inclusive, diminuição nas despesas de cultivo (ROEL, 2002). Dentre as diversas plantas que são utilizadas como inseticida botânico merece destaque o nim, *Azadirachta indica* A. Juss, que é uma espécie vegetal com grande potencial para o controle de insetos, principalmente, aqueles da

ordem Lepidoptera (ROEL *et al.*, 2010). Essa espécie vegetal causa diversos malefícios sobre os artrópodes como apresentar ação antialimentar, repelência, reduzir o crescimento da praga, inibir a ecdise, causar mortalidade e interferir na biologia do inseto (ROEL, 2001; COSTA *et al.*, 2004). Estudos têm demonstrado que o nim possui ação inseticida sobre *S. frugiperda*, apresentando resultados próximos àqueles alcançados com os defensivos sintéticos (MAREDIA *et al.*, 1992; MARTINEZ, 2002; PRATES *et al.*, 2003; VIANA e PRATES, 2003). Essa ação é proporcionada por substâncias secundárias encontradas na planta como azadiractina, salanina, melantriol e nimbina, além dessas, existem outros 20 compostos nessa planta que já foram identificados (BEVILACQUA *et al.*, 2008; HOWATT, 1994).

A ação de extratos vegetais de *Chenopodium ambrosioides* (L.), *Corymbia citriodora* (Hill e Johnson), *Chrysanthemum leucanthemum* (L.) e *A. indica* foi avaliada sobre *S. frugiperda* na concentração de 10 %. Os autores constataram que o extrato de *A. indica* apresentou efeito de repelência e de fago-deterência às lagartas desse inseto (MAZZONETTO *et al.*, 2013)

Em *A. indica*, além dos compostos secundários presentes na planta, também foram isolados e caracterizados microrganismos associados (CARDOSO, 2012). Segundo Zhang *et al.* (2011), os microrganismos associados às plantas podem ser uma ferramenta para melhorar o desempenho das culturas na agricultura, como também protegê-las do ataque de insetos-pragas e patógenos, fazendo com que estas culturas tenham uma considerável redução na população de insetos-pragas.

O efeito inseticida observado em *A. indica* pode estar relacionado a fatores como: metabólitos secundários produzidos pela planta; metabólitos produzidos pelos microrganismos associados à planta; metabólitos secundários produzido pelas plantas, devido à presença desses microrgânicos. Entretanto, o

que se sabe é que: o extrato vegetal de *A. indica* possui comprovada atividade inseticida e que esta planta possui microrganismos associados a ela. A hipótese deste trabalho é que os microrganismos associados à planta nim e isolados são patogênicos às lagartas de *S. frugiperda* são responsáveis pelo efeito inseticida observado nos extratos desta planta. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a patogenicidade dos microrganismos isolados da planta nim sobre lagartas de *S. frugiperda*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Spodoptera frugiperda*

#### 2.1.1 Descrição, biologia e hábito alimentar

A lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda*, pertence à Família Noctuidae, sendo também conhecida como lagarta dos milharais ou lagarta militar. Seus adultos são mariposas que medem de 35 a 40 mm de envergadura e 15 mm de comprimento. Suas asas anteriores são pardo-escuras e as posteriores branco-acinzentadas, apresentando regiões mais claras no centro. No macho, as asas anteriores apresentam manchas mais claras, diferenciando-os das fêmeas (ALVES *et al.*, 1992; CRUZ *et al.*, 1995; CRUZ *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2001; GALLO *et al.*, 2002). O adulto de *S. frugiperda* possui uma marca em forma de “V” voltado para frente nas asas anteriores (SILVA *et al.*, 2001).

Os ovos de *S. frugiperda* são inicialmente verdes-claros passando para o alaranjado após 12 a 15 horas da postura, tornando-se negros próximos à eclosão, devido à presença da cabeça da lagarta (CRUZ *et al.*, 1999; PAULA *et al.*, 2009). Os ovos são arredondados quando observados de cima e oblongos quando vistos de perfil, sendo achatados na superfície em que foram depositados. Eles são cobertos por escamas, que são depositadas pelas fêmeas (CRUZ *et al.*, 1999). As fêmeas colocam seus ovos de forma agrupada em número aproximado de 1.500, durante toda a fase adulta. Suas posturas são depositadas na página superior das folhas das plantas hospedeiras, em camadas, sendo o período de incubação de 3 dias, a 25 °C (ALVES *et al.*, 1992; CRUZ *et al.*, 1995; GALLO *et al.*, 2002; PAULA *et al.*, 2009). Em temperaturas

inferiores a 25 °C, o período de incubação pode chegar de 8 a 10 dias (PAULA *et al.*, 2009).

A lagarta apresenta, inicialmente, uma coloração que varia do pardo-escuro ao verde, chegando até a quase preta. Nessa fase do desenvolvimento, esse inseto apresenta, ao longo da região dorsal, três linhas finíssimas branco-amareladas; abaixo dessas linhas dorsais, na região lateral do corpo, é observada uma linha escura mais larga e, na parte inferior a esta, uma linha amarela irregular, marcada de vermelho. Na cabeça da lagarta é observado um “y” invertido (GALLO *et al.*, 2002; MARTINS e AFONSO, 2007).

As lagartas recém-eclodidas iniciam sua alimentação ingerindo o cório dos ovos (CRUZ, 1995). As lagartas de 1º e 2º ínstars raspam as folhas da planta hospedeira, provocando pequenas injúrias, enquanto as lagartas de 3º e 4º ínstars provocam injúrias maiores, pois fazem orifícios nas folhas (PEREIRA, 2007). Em milho, as lagartas, até o seu completo desenvolvimento, já atacaram todas as folhas centrais do cartucho, destruindo-o completamente. Nessa fase, esse inseto é normalmente encontrado no cartucho do milho, porém, também pode ser encontrado nos pendões, nas espigas e nas raízes adventícias das plantas. A duração larval varia de 12 a 30 dias, dependendo da temperatura, e as lagartas podem chegar até 50 mm de comprimento (CRUZ *et al.*, 1997; GALLO *et al.*, 2002; CRUZ e MONTEIRO, 2004; MARTINS e AFONSO, 2007; PAULA *et al.*, 2009).

As lagartas de *S. frugiperda* são canibais, por esse motivo é comum encontrar, ao final do ciclo do inseto, somente um indivíduo por cartucho. Entretanto, podem ser encontradas lagartas em diferentes ínstars em um mesmo cartucho, estando apenas separadas pelas lâminas das folhas. Ao final do ciclo larval, as lagartas penetram no solo, onde pupam (GALLO *et al.*, 2002; MARTINS e AFONSO, 2007).

A pupa de *S. frugiperda* mede, aproximadamente, 15 mm de comprimento, possuindo coloração que varia do avermelhado ao quase preto, sendo encontrada, geralmente, no solo. Essa fase, dura em média de 10 a 12 dias até a emergência dos adultos (FIGUEIREDO *et al.*, 2002). Entretanto, a duração da fase pupal pode variar de 6 a 55 dias, dependendo da temperatura (CRUZ *et al.*, 1999; GALLO *et al.*, 2002; MEREGE, 2001). Rosa *et al.* (2012) observaram variação na duração pupal de *S. frugiperda* de 3,3 a 11,4 dias, quando as lagartas foram alimentadas com diferentes linhagens de milho, a uma temperatura de 25 °C. Nesta temperatura, o ciclo total de *S. frugiperda* pode durar menos de 30 dias, possibilitando ao inseto ter de 12 a 15 gerações no ano (CRUZ *et al.*, 1999; CRUZ e MONTEIRO, 2004).

### **2.1.2 Importância econômica**

Os insetos do gênero *Spodoptera* estão distribuídos por todo o mundo, estando descritas 30 espécies das quais a metade é considerada praga de culturas de importância econômica (POGUE, 2002). *Spodoptera frugiperda* ocorre em quase todo o continente americano, causando sérios problemas fitossanitários e provocando prejuízos a uma grande variedade de culturas de importância econômica (CRUZ, 1995; PRAÇA *et al.*, 2006). É um inseto polífago com alta capacidade de dispersão e adaptação, ocorrendo no Brasil em praticamente todas as regiões produtoras de milho (PEREIRA, 2007). Esse inseto possui cerca de 80 hospedeiros descritos como algodão, milho e soja (POGUE, 2002; CAPINERA, 2008), trigo, sorgo, arroz, alfafa, feijão, amendoim, batata-doce, batatinha, repolho, espinafre, tomate, couve e abóbora (CRUZ, 1995; PRAÇA *et al.*, 2006). Ele se desenvolve em hospedeiros cultivados e também em não cultivados, provavelmente existindo muitos hospedeiros que ainda não foram

catalogados até o momento (SÁ *et al.*, 2009; PRASIFKA *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2010). Apesar do grande número de hospedeiros, *S. frugiperda* é considerada uma praga de plantas da família Poaceae (gramíneas), como o milho (CAPINERA, 2008).

Nagoshi (2009) comenta que o plantio de diferentes culturas hospedeiras de *S. frugiperda* em áreas próximas, mas que estejam em fases fenológicas diferentes pode favorecer a movimentação deste inseto entre estas plantas. Siloto (2002) informou que os danos causados por *S. frugiperda* às culturas dependem de fatores como o local de plantio, o estágio fenológico da planta, o tipo de solo, o clima e do vigor da planta. Nos trópicos os danos podem chegar a 60% do rendimento de grãos, sendo maiores nos períodos de seca e da emergência à maturação (CRUZ, 2002; GALLO *et al.*, 2002; PAPA, 2003).

No Brasil, *S. frugiperda* é considerada praga-chave do milho devido à sua ocorrência generalizada e o seu potencial de ataque em todas as fases de desenvolvimento desta planta, causando quedas no rendimento. As perdas são ainda maiores quando ocorrem na fase inicial da cultura, já que essa praga pode causar a morte das plântulas e reduzir significativamente o *stand*. O plantio do milho realizado o ano todo (safra/safrinha/inverno) somado a existência de plantas hospedeiras deste inseto na área tem contribuído para que *S. frugiperda* se prolifere e se torne bastante frequente nas plantações, sendo observada no milho durante o ano todo (CHOCOROSQUI, 2001; GALLO *et al.*, 2002; PAPA, 2006; PRADO *et al.*, 2004). Esse inseto tem seu controle dificultado devido ao grande número de hospedeiros que possui ao longo do ano. Em regiões com irrigação, como no Centro-Oeste, o plantio de milho no inverno amplia a disponibilidade de hospedeiros ao longo do ano (BARROS *et al.*, 2010).

*Spodoptera frugiperda* ataca o milho da fase de plântula até a formação da espiga. Quando o milho está com 4 a 6 folhas as perdas são inferiores a 9,0 %

da produção de grãos (CRUZ e TURPIN, 1982). Quando as plantas estão com 8 a 10 folhas, com cerca de 45 dias de idade, a produção pode ser reduzida em 19 %, sendo esse o período mais suscetível da cultura (CRUZ e TURPIN, 1982; PEREIRA, 2007). O período crítico ocorre perto do florescimento, quando ocorre diminuição na produção de aproximadamente 34 %, somente com os danos provocados nas folhas. As maiores perdas são causadas pelas lagartas de 5º e 6º ínstaes que destroem as plântulas, atacam o cartucho e provocam danos severos a plantas maiores (PEREIRA, 2007).

Nos períodos de seca ocorre mudança no comportamento da *S. frugiperda*, que passa a imitar os hábitos da lagarta-rosca (*Agrotis ipsylon* Hufnagel), cortando as plantas de milho rente ao solo, quando estas estão recém-germinadas, ou broqueando o colmo de plantas maiores (PEREIRA, 2007). As lagartas também podem danificar as espigas de milho de forma semelhante à lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea* Boddie). Nessa situação, a lagarta de *S. frugiperda* se desloca para a espiga, perfurando a palha e comendo os grãos (CRUZ *et al.*, 1997). O orifício provocado na espiga de milho pela lagarta é porta de entrada de patógenos (CRUZ *et al.*, 1997; CRUZ *et al.*, 1999). O ataque às espigas ocorre quando o período de seca coincide com o final do ciclo da cultura do milho (CRUZ *et al.*, 1997). As variedades de milho com ciclos mais curtos são as mais suscetíveis ao ataque de *S. frugiperda* na espiga, devido à emissão mais rápida do pendão. Após a lagarta destruir totalmente o cartucho do milho, antes de completar o seu ciclo de desenvolvimento, ela vai para o pendão atacar a espiga. É comum a lagarta seccionar o ponto de inserção da espiga, provocando perda total da planta.



### 2.1.3 Controle

O manejo de *S. frugiperda* tem sido feito quase que exclusivamente por meio de inseticidas químicos, sendo poucos aqueles que são seletivos aos inimigos naturais (GASSEN, 1996; GRÜTZMACHER *et al.*, 2000; VALICENTE e FONSECA, 2004). No Agrofit estão registrados 137 produtos (AGROFIT, 2013). Os inseticidas, apesar de reduzirem os danos provocados pelas pragas, têm a desvantagem de contaminar o ambiente, deixar resíduos nos alimentos, afetar negativamente os inimigos naturais e acelerar a seleção de populações de insetos resistentes (CARVALHO *et al.*, 2008).

A utilização de inseticidas químicos para o controle de *S. frugiperda* ocorre de forma intensa, já que o objetivo é a manutenção da população dessa praga abaixo do nível de dano econômico. Além disso, os produtores de milho nem sempre aceitam utilizar as técnicas alternativas de controle dessa praga disponíveis. Assim, o uso intensivo dos defensivos agrícolas tem reduzido a eficiência de alguns produtos químicos para o controle dessa praga, selecionando populações resistentes, como tem ocorrido com alguns piretroides e organofosforados (OMOTO *et al.*, 2000; DIEZ-RODRIGUES e CRUZ *et al.*, 2008). Isso tem feito com que sejam necessárias dosagens cada vez maiores dos produtos químicos, que tem eliminado os insetos susceptíveis a esses inseticidas, mas não os resistentes, além de afetarem os inimigos naturais e polinizadores (ALMEIDA *et al.*, 2007). A maioria dos estudos com *S. frugiperda* foi realizada para avaliar a eficiência de inseticidas para o controle desse inseto (MARTINS *et al.*, 2006). De acordo com Busato *et al.* (2006), a eficiência dos produtos químicos pode ser afetada pela época e modo de aplicação e pelo volume de calda aplicado. Os autores constataram maior eficiência dos inseticidas quando estes foram aplicados logo no início do ataque do inseto.

Cessa *et al.* (2013) observaram que a eficiência de controle de inseticidas sobre lagartas de *S. frugiperda* foi acima de 80 %, em até 48 horas após aplicação, quando se associaram os produtos dos grupos químicos Metilcarbamato de oxima, benzoilureia, Piretroide e Antranilamida. Já os demais inseticidas avaliados apresentaram eficiência superior a 80 % somente 72 horas após aplicação.

O desenvolvimento da biotecnologia levou à descoberta de uma nova técnica de controle de *S. frugiperda*, que consiste em utilizar plantas geneticamente modificadas e resistentes a insetos (FERNANDES *et al.*, 2003).

A biotecnologia possibilitou a introdução de genes da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*) em plantas de milho, originando o milho geneticamente modificado (GM). Segundo Mendes *et al.* (2011), a utilização do milho *Bt* reduz a aplicação de defensivos agrícolas e otimiza o manejo de pragas. Os benefícios são diminuição da poluição e resíduos tóxicos no ambiente, alimentos, água e solo, que são causados pelo uso excessivo de inseticidas. Na planta, o gene inserido codifica a expressão da proteína do *Bt*, proporcionando efetiva ação inseticida sobre *S. frugiperda* (LYNCH *et al.*, 1999; BARRY *et al.*, 2000; BUNTIN *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2002). As lagartas de *S. frugiperda*, ao comerem as folhas do milho *Bt*, ingerem também a proteína que vai atuar no mesêntero dos insetos. Neste local, a proteína provoca a ruptura da membrana que envolve o mesêntero, contribuindo para a morte do inseto (PIETRANTONIO *et al.*, 1993, GILL, 1995; MEYERS *et al.*, 1997). As plantas modificadas apresentam alta resistência a algumas espécies de Lepidoptera pragas do milho (ARMSTRONG *et al.*, 1995).

O milho GM foi liberado comercialmente nos EUA em 1996 e, a partir de então, outros países passaram a se utilizar dessa tecnologia (JAMES, 2007).

No Brasil, a liberação comercial de híbridos de milho GM só foi autorizada em 2008 (MICHELOTTO *et al.*, 2011).

No mundo já foram cultivados cerca de 50 milhões de hectares de milho GM, sendo esse o segundo maior cultivo (JAMES, 2011). As maiores áreas plantadas com GM ocorrem nos EUA, Brasil, Argentina e Canadá com 69,5; 36,6; 23,0 e 11,6 milhões de hectares, respectivamente. Entre os anos de 2011 a 2012 ocorreu um aumento em 6 % nas áreas plantadas com GM no mundo. No ano de 2012, pela primeira vez, os países em desenvolvimento superaram os países desenvolvidos em área plantada com GM (ORSI, 2013).

James (2011) comenta que, desde os primeiros cultivos comerciais de GM, que ocorreram entre 1996 e 2011, a área cultivada com transgênicos aumentou cerca de 100 vezes, atingindo aproximadamente 170 milhões de hectares em 2013, cultivos em 29 países. O Brasil responde por 21 % de toda a área plantada com transgênicos no mundo (ORSI, 2013).

A última safra 2012/2013 foi marcada por infestações de lagartas de *S. frugiperda* no milho *Bt*, tendo sido observada essa ocorrência em vários estados brasileiros plantadores de milho *Bt*. Esse fenômeno tem sido atribuído ao uso incorreto desta tecnologia, descuido no manejo e falta de áreas de refúgio (MESQUITA, 2013).

#### **2.1.4 Controle microbiano**

Segundo Parra *et al.* (2002), o controle biológico é um fenômeno que ocorre naturalmente, onde um organismo regula a população de outro. Esse método pode ser realizado através do uso de microrganismos que causam doenças nos insetos-pragas, sendo utilizados, principalmente, os fungos, que são

os responsáveis por cerca de 80 % dos males que ocorrem naturalmente nos insetos (ALMEIDA *et al.*, 2007; POLANCZYK *et al.*, 2010).

O uso de microrganismos entomopatogênicos é uma técnica de controle alternativo de *S. frugiperda* que pode ser utilizada para reduzir a pressão de seleção dos inseticidas químicos sobre essa praga e, inclusive, ser combinada a produtos químicos, podendo sinergicamente permitir a redução da dosagem dos mesmos (ANDALÓ *et al.*, 2004; GHINI e KIMATI, 2000; ROSENHEIM e HOY, 1986). Por esse motivo, é uma alternativa interessante para ser utilizada em substituição aos inseticidas químicos. É um método que se destaca pela alta eficiência no manejo de pragas, seletividade e baixo risco de contaminação ao ambiente e ao homem. Além disso, não necessita implementos especiais para a sua aplicação, visto que os equipamentos presentes nas propriedades podem ser utilizados na aplicação (ALMEIDA *et al.*, 2007; POLANCZYK *et al.*, 2010).

Segundo Loureiro e Moino Junior (2006), os agentes microbianos utilizados no controle de insetos não causam prejuízos ao homem, ao ambiente ou aos outros inimigos naturais, havendo necessidade, entretanto, de estudos que comprovem sua eficiência e o impacto causado por eles ao agroecossistema. De acordo com França *et al.* (2010), é necessário realizar estudos da interação dos microrganismos presentes no agroecossistema, pois esses podem afetar os inimigos naturais e outros organismos que fazem parte do sistema ecológico.

Polanczyk e Alves (2005) estudaram a interação entre *B. thuringiensis* e outros entomopatógenos, nematoides, vírus e fungos para o controle de *S. frugiperda*. Os autores verificaram que essa interação pode ser uma excelente ferramenta de aplicação no campo, uma vez que esses microrganismos não afetam um aos outros, tendo ação somente sobre os insetos-praga.

Polanczyk (2004) avaliou 83 isolados de *B. thuringiensis* sobre lagartas de 2º instar de *S. frugiperda*. Constatou que somente os isolados ESALQ 3.7 e 8.7 causaram mortalidade larval acima de 75,0 %.

Valicente (2008) estudou a ação de 4.700 isolados de *B. thuringiensis* sobre lagartas de *S. frugiperda* com 2 dias de idade. Ele observou que somente 169 isolados causaram mortalidade superior a 75,0 %, ou seja, apenas 3 % destes foram efetivos no controle de lagartas.

Baum (1999) discorreu sobre a dificuldade em se controlar lagartas de *S. frugiperda* utilizando bactérias. O autor alega existir diferenças entre os gêneros desses microrganismos.

Batista *et al.* (2005) avaliaram 1.375 isolados de *B. thuringiensis* sobre lagartas de 2º instar de *S. frugiperda*. Eles reportaram que apenas 26 isolados causaram mortalidade total das lagartas.

Valicente e Fonseca (2004) trabalharam com diferentes isolados de *B. thuringiensis tolworthi* para o controle de lagartas de *S. frugiperda* com dois dias de idade. Os isolados foram mais eficientes quando em maiores concentrações e quando tiveram um maior período de exposição (72 horas) à praga. Os autores relataram que a mortalidade das lagartas diminuiu com o aumento da idade do inseto e que não ocorreu interferência do patógeno sobre o desenvolvimento do inseto.

### **2.1.5 Efeito inseticida de Nim**

O uso de inseticidas botânicos é uma técnica antiga que deixou de ser sistematicamente utilizada quando foram descobertos os inseticidas sintéticos. Essa técnica que se baseia na utilização de extratos vegetais tem vantagens por ser biodegradável, ter ação rápida, possuir baixa toxicidade a mamíferos, ser

seletiva e apresentar baixa fitotoxicidade (MOREIRA *et al.*, 2005), podendo contribuir para a diminuição das despesas de cultivo (ROEL, 2002). Entretanto, apresenta desvantagens por ocorrer variações na sua eficiência que são devidas às diferenças nas concentrações do princípio ativo das plantas utilizadas e possuir baixo poder residual, fazendo com que esses produtos tenham que ser aplicados várias vezes, em um curto período de tempo (GALLO *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2005; ROEL *et al.*, 2000).

São várias as espécies de plantas utilizadas como inseticidas, especialmente as das famílias Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Annonaceae, Lamiaceae e Canellaceae, que são consideradas as mais promissoras no controle de insetos (JACOBSON, 1989). Na família Meliaceae está presente *Azadirachta indica*, nim, que possui o composto bioativo azadiractina, que causa efeito antialimentar, de repelência, de redução no crescimento do inseto, de inibição da ecdise, de mortalidade e interferência na biologia dos insetos, sendo destaque entre as plantas inseticidas (ROEL, 2001; COSTA *et al.*, 2004). *Azadirachta indica* tem vantagens na segurança alimentar e ambiental, possuindo potencial para ser utilizada no controle de insetos, principalmente os da ordem Lepidoptera (ROEL *et al.*, 2010).

Oliveira *et al.* (2006) estudaram a eficiência de produtos vegetais de *A. indica*, *Melia azedarach* L., *Quassia amara* L. e *Trichilia pallida* Sw. sobre lagartas de *S. frugiperda* na cultura do milho. Os autores constataram que os extratos aquosos de *A. indica* (2%), *T. pallida* (5 %), *Q. amara* (2 %) e *M. azedarach* (2 % e 5 %) e o óleo de *A. indica* (1 % e 2 %) não apresentaram a eficiência necessária para serem utilizadas em condições de campo, como o único método de controle dessa praga.

Roel *et al.* (2010) analisaram o efeito de óleos de nim sobre o desenvolvimento, sobrevivência e alterações histológicas causadas no intestino

de lagartas de *S. frugiperda* Eles observaram que este óleo, acrescentado à dieta artificial de lagartas causou mortalidade total, na concentração de 0,4 %, provocou alongamento nas durações larval e pupal e redução no peso de pupas. Em todas as concentrações de óleo de nim avaliadas foram observadas alterações no revestimento epitelial do intestino das lagartas.

Tavares *et al.* (2010) avaliaram os produtos naturais óleo de nim e extrato pirolenhoso e o inseticida sintético, lufenuron, sobre a mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* com 2, 4 e 6 dias de idade. Analisaram ainda a seletividade destes produtos sobre larvas de 4º instar do predador *Eriopis connexa* Germar. O óleo de nim e o lufenuron causaram as maiores mortalidades de lagartas com 4 e 6 dias de idade. O extrato pirolenhoso provocou a maior mortalidade de lagartas com 2 e 4 dias de idade. A mortalidade das larvas do predador foi menor quando expostas ao óleo de nim e ao extrato pirolenhoso do que quando em contato com o lufenuron. Os autores concluíram que o óleo de nim é recomendado para o controle de *S. frugiperda* por ter alta toxicidade à praga e ter baixa toxicidade às larvas do inimigo natural.

Garcia *et al.* (2010) estudaram o efeito do óleo de nim aplicado sobre plantas de milho resistentes e suscetíveis e sua ação sobre lagartas de *S. frugiperda*. No tratamento contendo óleo de nim ocorreu menor desfolha das plantas pelas lagartas e maior rendimento. Além disso, o óleo de nim permitiu uma maior proteção das plantas quando aplicado preventivamente, antes da praga atacar, exigindo, entretanto, reaplicação do produto em intervalos semanais.

## 2.2 Microrganismos associados às plantas

Os microrganismos endofíticos foram descritos por Bary em 1866 (AZEVEDO, 1998). São definidos como aqueles que vivem no interior das plantas, tanto em folhas, como em ramos e raízes, sem causarem nenhuma formação externa em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida (AZEVEDO *et al.*, 2002). Esses autores discutiram sobre a coevolução dos endofíticos com seus hospedeiros, em que a planta fornece abrigo e alimento e o microrganismo produz compostos tóxicos a fitófagos e patógenos. Azevedo e Araujo (2007) comentaram que esses microrganismos possuem a capacidade de crescer em meios de cultura, ou não, e de habitarem os tecidos ou órgãos vegetais, sem nenhum prejuízo ao hospedeiro. Já os microrganismos epifíticos são aqueles que habitam a superfície das plantas e as micorrizas, aquelas que são simbiotes aos seus hospedeiros, produzindo nódulos neles (AZEVEDO *et al.*, 2002).

Os microrganismos epifíticos foram citados pela primeira vez por Potter (1909), quando foram definidos como aqueles que vivem e se multiplicam na superfície das folhas. Esta superfície se caracteriza por apresentar variações de umidade, temperatura e nutrientes disponíveis (LINDOW e BRANDL, 2003).

Os principais microrganismos endofíticos encontrados nas folhas, caule e raízes são os fungos e as bactérias, que podem desempenhar funções como, proteção da planta hospedeira, atuando como agentes controladores de microrganismos patogênicos e de insetos-pragas e até mesmo de herbívoros (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO *et al.*, 2000; MARINHO *et al.*, 2009). Os epifíticos podem dividir seu nicho ecológico com os microrganismos patogênicos, competindo por nutrientes, podendo produzir substâncias potencialmente prejudiciais aos organismos invasores, como a quitinase (TROLEL-AZIL *et al.*, 2008).



Aravind *et al.* (2010) comentaram que os endofíticos podem atuar favorecendo o crescimento das plantas hospedeiras. Alberto *et al.* (2010) relataram que apesar de esses microrganismos viverem no interior das plantas sem causarem danos, podem, dependendo de condições adversas, se tornar patogênicos.

Os microrganismos endofíticos possuem habilidade de colonizar os tecidos internos das plantas, sendo esta uma ferramenta que pode ser utilizada para melhorar o desempenho das culturas agrícola. Possuem capacidade de proteger a planta contra o ataque de insetos-pragas e patógenos, devido aos metabólitos que produzem, fazendo com que as plantas tenham uma considerável redução na população de insetos que lhes causam danos (ZHANG *et al.*, 2011).

O uso de microrganismos endofíticos para o controle de insetos-pragas foi citado pela primeira vez nos anos 80, quando o autor mostrou o importante papel dos fungos endofíticos para a planta hospedeira. Esse autor observou que a presença desses fungos e seus metabólitos produzidos resultavam na diminuição das injúrias causadas pelos insetos (AZEVEDO, 2000).

Webber (1981) observou que o fungo endofítico *Phomopsis oblonga* (Desm.) controlava o besouro *Physocnemum brevilineum* (Say), vetor do agente causal *Ceratocystis ulmi* (Buisman). Esse controle foi feito a partir de um efeito de repelência do inseto aos compostos tóxicos produzidos pelo fungo endofítico, o que foi confirmado por Claydon *et al.* (1985) que constataram que o fungo endofítico sintetizava metabólitos secundários os quais afetavam as larvas do besouro. Gaynor e Hunt (1983) verificaram correlação entre as plantas contaminadas por fungos e a redução na frequência de ataque do besouro *Listronotus bonariensis* (Kuschel).

Ownley *et al.* (2010) relataram que *Beauveria Bassiana* (Vuill) pode agir tanto no controle de insetos como na inibição do crescimento de patógenos de planta, apresentando dupla finalidade. Os autores afirmaram que o controle realizado por esse microrganismo endofítico ocorre devido à competição por espaço, sendo esse um mecanismo de ação no controle biológico.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Controle Biológico e Bioatividade de Produtos Vegetais, de Patologia de Insetos e de Fitopatologia da Universidade Estadual de Montes Claros, UNIMONTES, *Campus* de Janaúba-MG. As lagartas de *S. frugiperda* utilizadas nos experimentos foram provenientes da criação estoque mantida no Laboratório de Entomologia da UNIMONTES. As bactérias adotadas nos experimentos foram obtidas junto a Bacterioteca do Laboratório de Fitopatologia da UNIMONTES, onde estão armazenadas em água mineral esterilizada, sob condição ambiental de laboratório. As bactérias foram isoladas de folhas de nim, *A. indica*, a partir de extratos fermentados de nim (Nim), da superfície das folhas desta planta (epifítica - Epi) e do mesófilo das folhas desta planta (endofítica - Endo).

#### 3.1 Obtenção de *Spodoptera frugiperda*

Lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda* foram transferidas para tubos de vidro (8,5 cm x 2,5 cm) de fundo chato, contendo a dieta artificial de GREENE *et al.* (1976). Essa dieta é constituída de feijão, caseína, germe de trigo, proteína de soja, levedo de cerveja (fontes proteica), ácido ascórbico, ácido sórbico, nipagin, solução vitamínica, tetraciclina (antibiótico), formaldeído (40 %), ágar e água. Antes da colocação da dieta artificial nos tubos, estes foram tampados com algodão hidrófobo e esterilizados em estufa de secagem e esterilização a 180 °C, por 4 horas. Após a colocação da dieta nos tubos, estes foram novamente esterilizados, agora externamente, em câmara de fluxo, utilizando luz germicida, por 20 minutos. Após esses procedimentos, as lagartas recém-eclodidas foram transferidas para os tubos, onde permaneceram se

alimentando da dieta artificial até a pupação. As pupas obtidas foram retiradas dos tubos, limpas e sexadas conforme Butt e Cantu (1962). Para a obtenção das posturas, cinco pupas machos e cinco fêmeas foram colocadas em uma placa de Petri (2 cm de altura x 12 cm de diâmetro) que serviu de base para uma gaiola constituída por um tubo de PVC (15 cm de diâmetro x 25 cm de altura). A extremidade superior dessa gaiola foi fechada com um tecido fino do tipo *voil*, preso por um elástico. Sobre o *voil* foi colocado um chumaço de algodão umedecido, para fornecimento de água aos insetos. Os adultos foram alimentados com uma solução de mel a 10 %. A parte interna do tubo de PVC foi forrada com papel-toalha, que serviu de substrato para postura. Diariamente, enquanto durou o período de postura das fêmeas, os ovos foram retirados, acondicionados em placas de Petri (12 cm x 2 cm), que foram tampadas e mantidas em laboratório sob condições controladas a  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotofase de 14 horas. Após a eclosão, as lagartas foram transferidas para a dieta artificial, reiniciando o ciclo.

### **3.2 Cultivo do milho**

Plantas de milho da variedade Ag 1051 foram cultivadas em canteiros preparados na área Experimental da UNIMONTES, *Campus* de Janaúba, MG. Para a preparação dos canteiros, estes foram capinados, visando à eliminação das ervas daninhas, e adubados, não tendo sido realizada aplicação de defensivos agrícolas. As folhas de milho foram cortadas em pedaços com tamanhos padronizados (3,0 cm x 2,0 cm), mergulhas ou não em suspensões bacterianas, visando à avaliação dos microrganismos e utilizadas na alimentação das lagartas de *S. frugiperda*.

### **3.3 Multiplicação e preparo das suspensões bacterianas**

As bactérias utilizadas nestes experimentos foram retiradas da Bacterioteca e repicadas em meio de cultura sólido TSA (Tryptic Soy Agar), que foi preparado a partir da transferência de 40 g do TSA em 1000 mL de água destilada e esterilizada. O meio preparado foi esterilizado em autoclave a 120 °C, durante 20 minutos e, então, levado à câmara de fluxo laminar, para ser vertido em placas de Petri (9 cm x 1,5 cm ). Após secagem do meio nas placas, foram repicadas as bactérias através da transferência de uma pequena alíquota, utilizando-se uma alça de platina. Essas placas foram levadas para câmara climatizada do tipo B.O.D e as bactérias incubadas a  $28 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % em escuro, pelo período de 48 horas.

As placas contendo as bactérias multiplicadas foram empregadas na preparação das suspensões. Para isso, nessas placas foram adicionados 10 mL de uma solução de NaCl (0,85 %) estéril. Após esse procedimento, as colônias foram raspadas com o auxílio de uma alça de Drigalski, obtendo-se a suspensão de célula bacteriana. Essa suspensão foi transferida para tubos de ensaio e, então, homogeneizada em aparelho Vortex. A suspensão homogeneizada foi levada ao espectrofotômetro e a concentração de célula bacteriana foi ajustada para 0,6 de absorbância em densidade óptica de 540 nm. Essa calibragem possui uma margem de erro tolerável de  $\pm 0,02$  de absorbância, para mais ou para menos (MARIANO, 2000).

### **3.4 Patogenicidade de bactérias isoladas de *Azadirachta indica* a lagartas *Spodoptera frugiperda***

Folhas de milho novas do cartucho foram coletadas dos canteiros na área experimental e levadas ao laboratório, onde foram lavadas com água corrente e postas para secar em temperatura ambiente, antes de serem cortadas em pedaços de 3,0 cm x 4,0 cm. Essas folhas cortadas foram levadas à câmara de fluxo para serem imersas nas suspensões bacterianas preparadas conforme descrito no item 3.3. Após a imersão, as folhas foram deixadas para secar no laboratório sobre folhas de papel-filtro estéril. As folhas de milho tratadas e secas foram transferidas para tubos de vidro (2,5 cm x 8,5 cm), juntamente com uma lagarta de *S. frugiperda*, com 10 dias de idade que foi retirada da criação estoque, onde estava sendo alimentada com dieta artificial. Como testemunha, foi fornecida às lagartas folhas de milho não tratadas.

Diariamente, enquanto durou o experimento, foram feitas observações quanto à mortalidade dos insetos avaliados e, sempre que necessário, foram oferecidas novas folhas de milho não tratadas. Apenas a primeira folha oferecida às lagartas foi tratada com a suspensão bacteriana, as subseqüentes foram somente lavadas em água corrente e secas. As lagartas permaneceram nestas condições até a pupação.

Os isolados avaliados foram: endofítico (Endo 01), obtidos a partir de extrato fermentado de folhas de nim (Nim 01, Nim 02, Nim 03, Nim 04, Nim 05, Nim 06, Nim 07, Nim 08, Nim 09, Nim 10, Nim 11, Nim 12, Nim 13, Nim 14, Nim 15, Nim 16, Nim 17 e Nim 18) e epifíticos (Epi 01, Epi 02, Epi 3, Epi 04, Epi 05, Epi 07, Epi 08, Epi 09, Epi 11, Epi 12, Epi 13, Epi 14, Epi 15 e Epi 16).

Foi avaliada a mortalidade larval e pupal, duração larval e pupal, peso de pupas macho e fêmea, obtido 24 horas após a pupação, e a deformação de pupas e adultos. Foram consideradas mortas as lagartas que não apresentavam movimento nem se alimentavam. Foram consideradas mortas as pupas que não apresentavam movimento no último urômero ou das quais não emergiram adulto. Foram consideradas deformadas as pupas que apresentavam uma “bolsa aquosa”, quitinação incompleta, características morfológicas larvais e para o caso dos adultos, aqueles que apresentavam asas defeituosas e com incapacidade de se desprender da pupa (NG *et al.*, 1985). A sexagem das pupas foi realizada conforme descrito por Butt e Cantu (1962). O cálculo da variável adulto viável foi obtido a partir do total de adultos normais emergidos nos tratamentos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 33 tratamentos (isolados bacterianos) e uma testemunha. Cada tratamento foi constituído por 50 repetições, sendo cada uma composta por uma lagarta de *S. frugiperda* com 10 dias de idade. Para a análise estatística, os dados foram agrupados, constituindo 10 repetições.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-knott, a 5% de probabilidade. As médias representadas por porcentagem (mortalidade larval e pupal e deformação de pupas e adultos) foram transformadas para raiz de  $(x + 1)$ . Para as análises, foi utilizado o programa estatístico SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2010).

#### **3.4.1 Contagem de células viáveis de bactérias isoladas de *Azadirachta indica***

Os 33 isolados bacterianos foram retirados da Bacterioteca, multiplicados em meio TSA e incubados em B.O.D., pelo período de 48 horas

em escuro conforme descrito no item 3.3. Transcorrido esse período, foram preparadas suspensões bacterianas utilizando-se solução salina (0,85 %) estéril, também conforme descrito no item 3.3. Essas suspensões foram ajustadas em Espectrofotômetro para uma absorbância 0,6 em densidade óptica de 540 nm.

Para a determinação das células viáveis, as suspensões bacterianas foram diluídas em série, em solução salina (0,85 %), até a concentração de  $10^{-7}$ , sendo plaqueadas para a determinação das unidades formadoras de colônias (UFC) somente as maiores diluições ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ ). Para o plaqueamento, foram utilizadas alíquotas de 10  $\mu$ L que foram transferidas para placas de Petri contendo meio sólido TSA. As bactérias foram incubadas em B.O.D. a 28 °C, UR de 70 %  $\pm$  10 em escuro, por 24 horas. Transcorrido esse período as colônias formadas foram contadas nas placas.

Para o cálculo da UFC/mL foi adotada a seguinte fórmula: UFC = média das contagens  $\times 10^x \times 10^2$  mL,

onde: x = diluição utilizada para a contagem da UFC (ROMEIRO, 2001).

### **3.5 Virulência de bactérias isoladas de *Azadirachta indica* sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda***

Os isolados bacterianos avaliados neste ensaio foram selecionados a partir dos resultados obtidos nos experimentos descritos no item 3.4. A seleção desses isolados se deu a partir dos maiores valores de mortalidade larval e pupal causados pelas bactérias a *S. frugiperda* e que apresentaram baixos valores de UFC, em uma absorbância de 0,6. Os isolados foram selecionados porque apresentavam UFC inferiores a  $10^8$ . Foi adotado esse procedimento por haver possibilidade de se aumentar o valor da absorbância desses isolados, visando



torná-los mais virulentos às lagartas. Neste trabalho foi considerada a concentração de  $10^8$  células/mL como a indicativa da patogenicidade da bactéria em laboratório.

Os isolados selecionados foram multiplicados no meio TSA e incubados em B.O.D., por 48 horas em escuro, conforme descrito no item 3.3. Após esse período, foram preparadas as suspensões bacterianas também de acordo com o descrito no item 3.3. As suspensões foram homogeneizadas e levadas ao espectrofotômetro e a concentração das células bacterianas foi ajustada para 0,8 de absorbância em uma densidade óptica de 540 nm, visando aumentar a concentração das células bacterianas, em relação ao experimento descrito no item 3.4.

Folhas de milho novas do cartucho foram coletadas na área experimental e levadas ao Laboratório, onde as folhas foram lavadas com água corrente e mantidas em temperatura ambiente para secar e, então, cortadas em pedaços de 3,0 cm x 4,0 cm. Os pedaços de folhas foram levados para câmara de fluxo para serem imersos nas suspensões bacterianas. As folhas foram secas em laboratório sobre papel-filtro estéril, antes de serem transferidas para os tubos de vidro. Nesse tubo foi adicionada uma lagarta de *S. frugiperda* com 10 dias de idade. Como testemunha, as lagartas foram alimentadas com folhas de milho não tratadas.

Foram avaliadas diariamente a mortalidade larval e a ocorrência de pupas e, quando necessário, as folhas de milho foram trocadas por outras não tratadas. As lagartas permaneceram nessas condições até a pupação.

Este experimento foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro tratamentos (isolados), cada um com 50 repetições. Cada repetição foi constituída por uma lagarta de *S. frugiperda* com

10 dias de idade. Para análise, os resultados foram agrupados constituindo 10 repetições.

Foram avaliadas a mortalidade larval e a pupal, duração larval e pupal, deformação de pupas e adultos e adultos viáveis. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-knott, a 5% de probabilidade, através do programa estatístico SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2010). As médias quando representadas por porcentagem (mortalidades larval e pupal e deformação de pupas e de adultos) foram transformadas por  $\sqrt{(x + 1)}$ .

### **3.5.1 Contagem de células viáveis de bactérias isoladas de *Azadirachta indica***

Os isolados avaliados no item 3.5 foram repicados em placas de Petri contendo meio de cultura TSA e incubados em B.O.D., por 48 horas em escuro, conforme item 3.3. As suspensões bacterianas foram preparadas de acordo com o descrito no item 3.3. e calibradas em espectrofotômetro para absorvância de 0,8 e densidade óptica de 540 nm (MARIANO, 2000). Para a determinação das células viáveis, as suspensões bacterianas foram diluídas em serie até a concentração de  $10^{-8}$ . O plaqueamento e a contagem do número de UFC foram realizados conforme descrito no item 3.4.1.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Patogenicidade de bactérias isoladas de *Azadirachta indica* sobre lagartas *Spodoptera frugiperda*

Neste trabalho, 33 isolados de bactérias obtidas de folhas da planta nim através de extrato fermentado, bactérias epifíticas e endofíticas foram avaliados sobre o desenvolvimento de *S. frugiperda*. O conhecimento da ação desses microrganismos sobre um importante inseto-praga como a *S. frugiperda* pode contribuir para o entendimento da bioatividade dessa planta inseticida sobre outros insetos-pragas.

A duração larval de *S. frugiperda* foi afetada significativamente pela ingestão de folhas de milho tratadas com as suspensões bacterianas (Tabela 1). Essa variável sofreu alongamento ou redução, dependendo do isolado que foi ingerido pelas lagartas de *S. frugiperda*, quando estavam com 10 dias de idade. Tanto quando ocorreu alongamento da fase larval como quando ela foi reduzida, a variação em dias, em relação à testemunha, foi de no máximo quatro dias. Os isolados que provocaram o aumento na duração da fase larval de *S. frugiperda* foram Epi 01, Epi 07, Epi 11, Epi 12, Epi 13, Nim 02, Nim 04, Nim 05, Nim 11, Nim 15 e Nim 16. Os isolados que provocaram redução nesta fase foram Endo 01, Epi 02, Epi 03, Epi 04, Epi 05, Epi 08, Epi 09, Epi 14, Epi 15, Epi 16, Nim 06, Nim 07, Nim 08, Nim 09, Nim 10, Nim 12, Nim 13, Nim 14, Nim 17 e Nim 18. A ingestão dos isolados Nim 01 e Nim 03 não alteraram a duração larval de *S. frugiperda*, pois apresentaram duração semelhante à testemunha.

O isolado Epi 12 foi aquele que provocou a maior alteração na duração larval, em relação às demais bactérias avaliadas. Esse efeito foi interessante de ser observado, já que esta ocorrência fará com que o inseto demore mais para

pupar, por exemplo, se expondo mais aos inimigos naturais. Além disso, esse inseto terá que passar por mais trocas de tegumento o que acarretará um gasto maior de energia. Quanto a reduzir a duração da fase larval, onze dos isolados causaram esse efeito sobre *S. frugiperda*. Entretanto, esse efeito da bactéria sobre o inseto só será considerado nocivo se vier acompanhado de um alongamento na duração pupal ou mesmo a deformações de pupas e adultos. Outro fato interessante a se considerar quanto à redução na duração larval é que ela pode causar redução no peso das pupas. Essa redução em pupas fêmeas poderá torná-las inférteis ou mesmo reduzir sua fecundidade.

Alterações na duração larval também já foram constatadas por outros autores como Lima *et al.* (2010), que observaram alongamento na duração larval de *S. frugiperda*, quando estas foram alimentadas com formulados de nim associado a *B. thuringiensis*.

A mortalidade larval de *S. frugiperda* também foi afetada significativamente pela ingestão de folhas de milho tratadas com as suspensões bacterianas (Tabela 1). As bactérias avaliadas causaram no máximo 34,0 % de mortalidade, sendo esse valor observado quando as lagartas ingeriram as folhas de milho tratadas com o isolado Nim 05. Adicionalmente, outros 15,0 % dos isolados também provocaram valores de mortalidade larval semelhantes ao isolado Nim 05. Estes isolados foram o Epi 07, Epi 12, Epi 13, Nim 11 e Nim 16, para os quais a mortalidade larval variou de 26,0 % a 30,0 %. Dos 33 isolados avaliados, 12,0 % causaram mortalidades inferiores ao grupo citado acima, mas superiores à testemunha, causando de 16,0 % a 22,0 % de morte. Todavia, 70% dos isolados causaram mortalidade semelhantes à testemunha.

A baixa mortalidade larval constatada neste experimento também já foi relatada por outros pesquisadores. Polanczyk (2004), por exemplo, avaliaram 83 isolados de *B. thuringiensis* sobre lagartas de 2º instar de *S. frugiperda*,

selecionando apenas dois que causaram elevada mortalidade, ESALQ 3.7 e ESALQ 8.7. Valicente (2008) analisou 4.700 isolados de *B. thuringiensis* sobre lagartas de *S. frugiperda* com 2 dias de idade. O autor considerou eficiente o isolado que causava mortalidade acima de 75,0 %, sendo que apenas 3,0 % deles atenderam a essas condições. Bohorova *et al.* (1996) avaliaram mais de 400 isolados sobre as principais pragas da cultura do milho e observaram que 99,0 % desses provocaram menos do que 50 % de mortalidade.

Os valores de mortalidade larval constatados neste experimento variaram de 0,0 a 34,0 %, sendo considerados baixos se comparados ao esperado para um entomopatógeno. Entretanto, neste experimento foi observado que uma parte dos isolados avaliados provocou efeitos nocivos sobre as outras fases do ciclo biológico do inseto demonstrando que alguns desses microrganismos se mostraram muito promissores.

Segundo Valicente e Fonseca (2004), um aspecto relevante a ser considerado está relacionado aos efeitos secundários causados pelos patógenos sobre os insetos que, mesmo não provocando mortalidade total, podem afetar o desenvolvimento da praga de tal forma que esta não consiga causar dano.

A duração pupal de *S. frugiperda* também foi afetada significativamente pela ingestão de folhas de milho tratadas com as suspensões de bactérias isoladas do nim (Tabela 1). A ingestão de folhas de milho tratadas com as suspensões dos isolados Epi 02, Epi 03, Epi 04, Epi 05, Epi 08, Epi 09, Epi 11, Epi 13, Epi 15, Nim 05, Nim 10, Nim 11, Nim 12, Nim 14, Nim 15, Nim 16, Nim 17 e Nim 18 provocaram alongamento na duração dessa fase que foi de menos de um dia, quando comparado com a testemunha.

Salama *et al.* (1981) também constataram alongamento na duração de pupas quando lagartas de *S. frugiperda* ingeriram a bactéria *B. thuringiensis*. Já, Valicente e Fonseca (2004) não registraram efeito da ingestão de *B. thuringiensis*

sobre a duração pupal de *S. frugiperda*, independente da concentração utilizada e do tempo de exposição a esta.

O aumento na duração pupal desse inseto provocado pela ingestão de alguns isolados foi uma importante constatação para ser utilizada no manejo de pragas, uma vez que essa ocorrência pode contribuir para a redução do número de gerações da praga no ano. A duração pupal foi afetada por cerca de 54,0 % dos isolados bacterianos que fizeram com essa fase fosse maior que a da testemunha, aumentando o tempo necessário para o inseto emergir.

A mortalidade pupal de *S. frugiperda* foi afetada significativamente pela ingestão de folhas de milho tratadas com as suspensões de bactérias isoladas de nim (Tabela 1). A ingestão de folhas de milho tratadas com suspensão dos isolados Epi 01, Epi 04, Epi 07, Epi 09, Epi 11, Epi 13, Epi 15, Nim 06, Nim 07, Nim 08, Nim 10, Nim 12, Nim 14 e Nim 15 provocaram aumento na mortalidade pupal que foi maior que a testemunha. Os isolados que causaram elevada mortalidade das pupas corresponderam a 42,0 % do total de isolados avaliados, provocando valores que variaram de 13,0 a 27,0 %.

Autores como Campos e Boiça Junior (2012), avaliando o óleo de nim, ao invés de isolados bacterianos extraídos dessa planta, verificaram que esse produto causou até 100,0 % de mortalidade de lagartas de 3º ínstar e pupas, nas maiores concentrações avaliadas. Valicente e Fonseca (2004) não observaram mortalidade de pupas, quando avaliaram isolados de *B. thuringiensis tolworthi* sobre lagartas de 1º ínstar de *S. frugiperda*. Por sua vez, Salama *et al.* (1981) relataram aumento na mortalidade de pupas, quando comparado com a testemunha, avaliando a ingestão de *B. thuringiensis* por lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda*.

**TABELA 1.** Duração e mortalidade larval e pupal de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas com suspensões de bactérias isoladas de plantas de nim, *Azadirachta indica* (continua).

Tratamentos	Larvas		Pupas	
	Duração (Dias)	Mortalidade (%)	Duração (Dias)	Mortalidade (%)
<b>Testemunha</b>	22,2 c	9,0 a	9,4 a	9,2 a
<b>Endo 01</b>	21,5 b	4,0 a	9,0 a	10,0 a
<b>Epi 01</b>	25,4e	14,0 a	9,3 a	19,8 b
<b>Epi 02</b>	18,8 a	6,0 a	9,7 b	8,0 a
<b>Epi 03</b>	21,3 b	10,0 a	9,5 b	2,0 a
<b>Epi 04</b>	20,5 b	8,0 a	9,8 b	15,5 b
<b>Epi 05</b>	19,1 a	0,0 a	9,6 b	10,0 a
<b>Epi 07</b>	24,7 e	24,0 c	9,3 a	27,3 b
<b>Epi 08</b>	19,2 a	10,0 a	9,6 b	2,5 a
<b>Epi 09</b>	20,7 b	22,0 b	9,6 b	25,2 b
<b>Epi 11</b>	24,3 e	10,0 a	9,6 b	15,0 b
<b>Epi 12</b>	26,5 f	28,0 c	9,0 a	10,0 a
<b>Epi 13</b>	23,7 d	26,0 c	9,7 b	15,3 b
<b>Epi 14</b>	21,5 b	18,0 b	9,1 a	7,5 a
<b>Epi 15</b>	20,6 b	10,0 a	9,8 b	13,0 b
<b>Epi 16</b>	19,4 a	2,0 a	9,4 a	10,5 a
<b>Nim 01</b>	22,4 c	10,0 a	9,2 a	11,8 a
<b>Nim 02</b>	23,8 d	6,0 a	9,3 a	6,5 a
<b>Nim 03</b>	22,9 c	0,0 a	9,1 a	2,0 a

...Continua...

TABELA 1. Cont.

Tratamentos	Larvas		Pupas	
	Duração (Dias)	Mortalidade (%)	Duração (Dias)	Mortalidade (%)
<b>Nim 04</b>	24,3 e	6,0 a	9,1 a	4,0 a
<b>Nim 05</b>	23,2 d	34,0 c	9,6 b	10,7 a
<b>Nim 06</b>	20,1 a	16,0 b	9,0 a	13,0 b
<b>Nim 07</b>	19,9 a	8,0 a	9,8 b	19,0 b
<b>Nim 08</b>	20,7 b	10,0 a	8,9 a	15,0 b
<b>Nim 09</b>	19,6 a	6,0 a	9,2 a	4,5 a
<b>Nim 10</b>	21,0 b	8,0 a	9,8 b	19,5 b
<b>Nim 11</b>	24,9 e	30,0 c	9,9 b	9,2 a
<b>Nim 12</b>	20,0 a	6,0 a	10,0 b	16,5 b
<b>Nim 13</b>	19,4 a	4,0 a	9,1 a	5,0 a
<b>Nim 14</b>	19,3 a	2,0 a	9,7 b	18,5 b
<b>Nim 15</b>	25,0 e	10,0 a	9,7 b	23,0 b
<b>Nim 16</b>	24,2 e	24,0 c	9,7 b	9,3 a
<b>Nim 17</b>	21,0 b	18,0 b	9,5 b	5,0 a
<b>Nim 18</b>	19,3 a	4,0 a	9,5 b	2,0 a
<b>CV</b>	5,66	67,89	8,54	128,59

\*Medias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade.

O peso de pupas macho, provenientes de lagartas que ingeriram folhas tratadas com suspensões bacterianas foi afetado significativamente (Tabela 2). A ingestão destas folhas provocou tanto aumento como redução no peso das pupas, em relação à testemunha. Os isolados que reduziram o peso das pupas macho



foram Epi 02, Epi 05, Epi 07, Epi 08, Epi 09, Epi 11, Epi 12, Epi 13, Epi 15, Epi 16, Nim 01, Nim 02, Nim 03, Nim 04, Nim 05, Nim 06, Nim 09, Nim 12, Nim 13, Nim 14, Nim 15, Nim 16 e Nim 18. Do total de bactérias avaliadas, esses isolados corresponderam a 58,0 %; já aqueles que provocaram aumento no peso das pupas macho foram Epi 01, Epi 04, Nim 07, Nim 08, Nim 10 e Nim 17, que totalizaram 21,0 % dos microrganismos testados. Os demais tratamentos proporcionaram pesos semelhantes à testemunha.

O peso das pupas fêmeas também foi afetado significativamente pela ingestão de folhas de milho tratadas com suspensões bacterianas, ocorrendo em alguns tratamentos redução do peso e, em outros, aumento (Tabela 2). Os tratamentos que provocaram redução no peso das pupas fêmeas foram Epi 01, Epi 02, Epi 05, Epi 07, Epi 08, Epi 11, Epi 12, Epi 13, Epi 15, Epi 16, Nim 01, Nim 03, Nim 09, Nim 12, Nim 13, Nim 14, Nim 15, Nim 16 e Nim 18, totalizando 57,5 % dos isolados avaliados. Por outro lado, os isolados que provocaram aumento no peso das pupas foram Endo 01, Epi 03, Epi 04, Nim 04, Nim 06, Nim 08 e Nim 10, correspondendo a 21,2 % dos isolados avaliados. Nos demais tratamentos foram observados pesos semelhantes à testemunha.

A redução no peso de pupas é um efeito interessante de se observar, pois, segundo Boller e Chambers (1977), pupas fêmeas que apresentaram pesos menores deram origem a insetos adultos que colocaram menor número de ovos, em relação aos insetos saudáveis e com pesos maiores (POLANCZYK e ALVES, 2005). Esses mesmos autores observaram que 54,5 e 42,4 % dos isolados avaliados reduziram o peso de pupas machos e fêmeas em aproximadamente 23,9 e 29,5 %, respectivamente.

Ramachandram *et al.* (1993) não verificaram alteração no peso de pupas das mariposas *Choristoneura fumiferana* (Clemens) e *Hyphantria cunea* (Drury), após esses insetos terem ingerido isolados bacterianos. Salama *et al.* (1981)

observaram que a ingestão de *B. thuringiensis* reduziu o peso de pupas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval), *Spodoptera exigua* (Hubner) e *Helicoverpa armigera* (Hübner). Todavia, Valicente e Fonseca (2004) não constataram o mesmo para pupas de *S. frugiperda*. Isso indica que os efeitos sobre o desenvolvimento podem variar de acordo com inseto avaliado e o microrganismo utilizado.

A deformação de adultos foi afetada pela ingestão das lagartas de folhas tratadas com os isolados bacterianos de nim (Tabela 2). Os isolados Epi 01, Epi 02, Epi 05, Epi 13, Epi 16, Nim 08, Nim 09, Nim 10, Nim 11, Nim 12, Nim 13, Nim 14 e Nim 18, que corresponderam a 39,4 % dos isolados avaliados, provocaram deformações nos adultos que foram superiores à testemunha e variaram de 17,0 % a 31,0 %.

Valicente e Fonseca (2004) demonstraram que a ingestão de *B. thuringiensis* por lagartas de *S. frugiperda* não interferiu no inseto a ponto de provocar deformação nos adultos. Salama *et al.* (1981) observaram aumento na deformação de adulto de *S. littoralis*, *S. exigua* e *H. armigera*.

A porcentagem de adultos viáveis de *S. frugiperda* variou significativamente e foi influenciada pela ingestão de folhas tratadas pelas lagartas (Tabela 2). Os isolados que proporcionaram as menores porcentagens de adultos viáveis foram Epi 01, Epi 07, Epi 09, Epi 12, Epi 13, Nim 05, Nim 08, Nim 10, Nim 11, Nim 12, Nim 14 e Nim 15. Esses isolados que reduziram a viabilidade dos adultos em relação à testemunha corresponderam a 36,4 % dos isolados avaliados.

A redução na porcentagem de adultos viáveis causada por alguns isolados demonstra que esses microrganismos interferiram no ciclo de desenvolvimento de *S. frugiperda*. No geral, os isolados não causaram elevadas mortalidades

larvais, mas afetaram o inseto a ponto de interferir na sua sobrevivência, pois atingiram todas as fases do ciclo do inseto.

**TABELA 2.** Peso de pupas macho e fêmea, deformação de adultos e adultos viáveis de *Spodoptera frugiperda*, provenientes de lagartas alimentadas com folhas de milho tratadas com suspensões bacterianas isoladas de plantas de nim, *Azadirachta indica* (continua).

Isolados	Peso pupas (mg)		Deformação adultos (%)	Adultos viáveis (%)
	Macho	Fêmea		
<b>Testemunha</b>	185,7 b	182,3 b	9,5 a	72,5 b
<b>Endo 01</b>	211,1 c	197,5 c	10,5 a	75,6 b
<b>Epi 01</b>	181,7 b	149,6 a	19,5 b	56,0 a
<b>Epi 02</b>	152,3 a	148,7 a	18,8 b	70,0 b
<b>Epi 03</b>	192,2 b	186,9 c	11,0 a	78,0 b
<b>Epi 04</b>	231,8 c	198,4 c	7,8 a	72,0 b
<b>Epi 05</b>	147,7 a	141,5 a	25,0 b	66,0 b
<b>Epi 07</b>	159,9 a	148,6 a	15,8 a	44,0 a
<b>Epi 08</b>	144,2 a	142,6 a	10,5 a	78,0 b
<b>Epi 09</b>	154,8 a	170,9 b	17,5 a	48,0 a
<b>Epi 11</b>	162,4 a	138,3 a	9,0 a	68,0 b
<b>Epi 12</b>	156,6 a	147,3 a	14,8 a	56,0 a
<b>Epi 13</b>	165,5 a	136,2 a	19,3 b	52,0 a
<b>Epi 14</b>	186,0 b	168,1 b	4,0 a	72,0 b
<b>Epi 15</b>	157,4 a	150,0 a	10,8 a	70,0 b
<b>Epi 16</b>	141,4 a	135,2 a	24,0 b	66,0 b
<b>Nim 01</b>	174,8 a	158,2 a	7,3 a	70,0 b
<b>Nim 02</b>	156,8 a	172,6 b	7,0 a	82,0 b

...Continua...

Tabela 2. Cont.

Isolados	Peso pupas (mg)		Deformação	Adultos viáveis
	Macho	Fêmea	Adultos (%)	(%)
<b>Nim 03</b>	175,3 a	146,4 a	2,0 a	96,0 b
<b>Nim 04</b>	175,3 a	194,2 c	0,0 a	90,0 b
<b>Nim 05</b>	189,1 a	183,1 b	9,1 a	52,0 a
<b>Nim 06</b>	184,3 a	192,4 c	9,0 a	66,0 b
<b>Nim 07</b>	212,4 c	180,4 b	4,5 a	70,0 b
<b>Nim 08</b>	209,4 c	209,1 c	21,4 b	60,0 a
<b>Nim 09</b>	144,3 a	128,4 a	23,5 b	70,0 b
<b>Nim 10</b>	219,6 c	201,8 c	18,3 b	58,0 a
<b>Nim 11</b>	187,8 b	169,8 b	28,2 b	46,0 a
<b>Nim 12</b>	162,0 a	140,8 a	31,6 b	50,0 a
<b>Nim 13</b>	146,0 a	131,2 a	17,5 b	76,0 b
<b>Nim 14</b>	150,5 a	134,3 a	29,0 b	58,0 a
<b>Nim 15</b>	170,1 a	156,9 a	17,8 a	60,0 a
<b>Nim 16</b>	162,9 a	142,1 a	3,3 a	66,0 b
<b>Nim 17</b>	210,1 c	170,9 b	9,5 a	72,0 b
<b>Nim 18</b>	153,9 a	142,3 a	20,7 b	72,0 b
<b>CV</b>	15,23	15,20	73,23	18,55

\*Medias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

A deformação de pupas não foi afetada pela ingestão das lagartas de folhas tratadas com suspensões bacterianas (Figura 2). Valicente e Fonseca

(2004) também não constataram a ocorrência de deformação de pupas quando avaliaram *S. frugiperda* exposta a *B. thuringiensis*. Já, Salama *et al.* (1981) verificaram esse efeito sobre *S. frugiperda* expostas a *B. thuringiensis*.

Neste trabalho, nenhum dos isolados avaliados se destacou por ter provocado elevadas mortalidades larval e pupal de *S. frugiperda*, apesar de que 94,0 % deles afetaram alguma fase do ciclo desta praga, em função de alterações provocadas no ciclo do inseto. As bactérias ingeridas pelas lagartas causaram pouca mortalidade larval e pupal, aumento na duração larval, redução nos pesos de pupas macho e fêmea e deformação nos adultos. Entretanto, somente o isolado Epi 13 provocou todas essas alterações no ciclo do inseto, os demais alteraram uma ou outro dessas variáveis. Apesar do pequeno efeito nocivo, a ingestão das bactérias pelas lagartas reduziu em até 56,0s% a porcentagem de adultos viáveis à reprodução, variável obtida a partir do desconto dos indivíduos mortos e deformados ao longo do desenvolvimento do inseto. Nessa situação estão os isolados Epi 01, Epi 07, Epi 09, Epi 12, Epi 13, Nim 05, Nim 08, Nim 10, Nim 11, Nim 12, Nim 14 e Nim 15, que corresponderam a 36,4 % dos isolados avaliados. A ingestão desses isolados pelas lagartas proporcionaram porcentagens de adultos viáveis que variaram de 40,0 % a 56,0 %. Assim, esses isolados se mostraram adequados para reduzir a população de *S. frugiperda*, mesmo quando as lagartas estiveram em instares mais avançados, como foi o caso deste experimento.

Baseada nessa constatação, pode-se supor que, se esse inseto tivesse sido avaliado quando estava no 1º instar larval, as bactérias poderiam ter sido mais efetivas e virulentas a *S. frugiperda*. Esse comentário está embasado em constatações feitas por outros autores como Bai *et al.* (1992), que observaram que as lagartas de *S. frugiperda* no 6º instar foram mais resistentes a algumas toxinas de *B. thuringiensis* do que aquelas que estavam no 1º instar. Da mesma

forma Dutton *et al.* (2005) que observaram uma maior mortalidade de lagartas de *S. littoralis* em milho N4640 *Bt*, quando este inseto estava nos primeiros ínstar. Os autores relataram que as lagartas maiores foram menos sensíveis às toxinas do *Bt* e apresentavam alterações na atividade das proteases presentes no suco intestinal.

Keller *et al.* (1996) também observaram alta atividade proteolítica no suco intestinal de *S. littoralis*, quando estas estavam nos últimos ínstar larvais. Esses autores verificaram que as lagartas apresentavam habilidade para degradar totalmente a proteína Cry 1C do *B. thuringiensis*.

Neste trabalho, se tivessem sido utilizadas lagartas de 1º ínstar ao invés daquelas com 10 dias de idade poderia ter sido evitado que o inseto tivesse ingerido a dieta artificial contendo antibiótico à base de tetraciclina. Assim, a baixa patogenicidade dos isolados bacterianos sobre as lagartas pode ter sido causada por esse motivo, já que os anticontaminantes são ingredientes básicos da dieta artificial de *S. frugiperda*. A presença desta substância pode ter reduzido a capacidade de infecção do patógeno às lagartas. Fazem-se necessários novos estudos, utilizando estes mesmos isolados, mas avaliados sobre lagartas de 1º ínstar, que não tenham sido alimentadas com dieta artificial, mas sim, com folhas de milho.

A contagem do número de células viáveis de cada um dos isolados bacterianos avaliados demonstrou que esses microrganismos foram comparados em diferentes concentrações que variaram de  $10^5$  a  $10^{10}$  UFC/mL (Tabela 3). Os resultados demonstraram que o ajuste da concentração das suspensões bacterianas para uma absorbância de 0,6 não padronizou as amostras. Assim, os isolados foram oferecidos às lagartas em quantidade de inóculo diferentes, podendo ter sido este um dos motivos da infectividade variável que as bactérias apresentaram sobre o inseto.

Neste experimento, afetando a fase larval de *S. frugiperda* foram encontrados 11 isolados bacterianos os quais aumentaram a duração da fase larval e 13 que aumentaram a mortalidade larval, que foram maiores que a testemunha (Tabela 3). Para a fase de pupas, foram encontrados 18 isolados que aumentaram a duração da fase de pupas e 24 isolados que reduziram os pesos de pupas machos e fêmeas. Para a fase adulta 12 dos isolados provocaram aumento na deformação, que foi maior que a testemunha. Já, a ingestão dos isolados Endo 01 e Epi 14 não afetou nenhuma das fases do inseto.



**TABELA 3.** Unidades formadoras de colônias (UFC) e variáveis biológicas de *Spodoptera frugiperda* avaliadas após a ingestão pelas lagartas de folhas de milho tratadas com suspensão bacteriana isoladas de plantas de nim, *Azadirachta indica* (continua).

<b>Isolados</b>	<b>UFC/mL<sup>1</sup></b>	<b>DL<sup>2</sup></b>	<b>ML<sup>3</sup></b>	<b>DP<sup>4</sup></b>	<b>PPM<sup>5</sup></b>	<b>PPF<sup>6</sup></b>	<b>DA<sup>7</sup></b>
<b>Endo 01</b>	1,4 x 10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-
<b>Epi 01</b>	7,1 x 10 <sup>7</sup>	+	-	-	-	+	+
<b>Epi 02</b>	8,4 x 10 <sup>10</sup>	-	-	-	+	+	+
<b>Epi 03</b>	2,9 x 10 <sup>9</sup>	-	-	+	-	-	-
<b>Epi 04</b>	6,7 x 10 <sup>7</sup>	-	-	+	-	-	-
<b>Epi 05</b>	2,4 x 10 <sup>10</sup>	-	-	-	+	+	+
<b>Epi 07</b>	2,9 x 10 <sup>6</sup>	+	+	-	+	+	-
<b>Epi 08</b>	4,9 x 10 <sup>9</sup>	-	-	-	+	+	-
<b>Epi 09</b>	1,9 x 10 <sup>6</sup>	-	+	+	+	-	-
<b>Epi 11</b>	9,6 x 10 <sup>6</sup>	+	-	+	+	+	-
<b>Epi 12</b>	4,8 x 10 <sup>7</sup>	+	+	-	+	+	-
<b>Epi 13</b>	2,9 x 10 <sup>7</sup>	+	+	+	+	+	+
<b>Epi 14</b>	3,8 x 10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-
<b>Epi 15</b>	3,3 x 10 <sup>6</sup>	-	+	+	+	+	-
<b>Epi 16</b>	1,4 x 10 <sup>7</sup>	-	+	+	+	+	+
<b>Nim 01</b>	9,5 x 10 <sup>7</sup>	-	+	-	+	+	-
<b>Nim 02</b>	1,4 x 10 <sup>6</sup>	+	-	-	+	-	-
<b>Nim 03</b>	1,9 x 10 <sup>7</sup>	-	-	+	+	+	-
<b>Nim 04</b>	3,8 x 10 <sup>7</sup>	+	-	-	+	-	-
<b>Nim 05</b>	9,5 x 10 <sup>7</sup>	+	+	+	+	-	-
<b>Nim 06</b>	1,4 x 10 <sup>7</sup>	-	+	-	+	-	-

...Continua...

TABELA 3. Cont.

Isolados	UFC/ml	DL	ML	DP	PPM	PPF	DA
Nim 07	1,4 x 10 <sup>7</sup>	-	+	+	-	-	-
Nim 08	2,4 x 10 <sup>7</sup>	-	-	+	-	-	+
Nim 09	6,8 x 10 <sup>8</sup>	-	-	-	+	+	+
Nim 10	1,9 x 10 <sup>7</sup>	-	-	-	-	-	+
Nim 11	8,6 x 10 <sup>6</sup>	+	+	+	-	-	+
Nim 12	3,5 x 10 <sup>10</sup>	-	-	+	+	+	+
Nim 13	1,4 x 10 <sup>6</sup>	-	-	+	+	+	+
Nim 14	2,0 x 10 <sup>9</sup>	-	-	+	+	+	+
Nim 15	9,0 x 10 <sup>7</sup>	+	-	+	+	+	-
Nim 16	4,1 x 10 <sup>8</sup>	+	+	+	+	+	-
Nim 17	2,0 x 10 <sup>7</sup>	-	+	-	-	-	-
Nim 18	2,2 x 10 <sup>10</sup>	-	-	+	+	+	+

<sup>1</sup>Duração larval maior que a testemunha (DL), <sup>2</sup>mortalidade larval maior que testemunha (ML), <sup>3</sup>duração pupal maior que testemunha (DP), <sup>4</sup>peso de pupas machos menor que a testemunha (PPM), <sup>5</sup>peso de pupas fêmeas menor que a testemunha (PPF), <sup>6</sup>deformação de adultos maior que testemunha (DA). Os sinais + e - representam a ocorrência desse efeito no inseto causada pelo isolado bacteriano (tratamento).

Baseado nos resultados deste experimento, que foi realizado com os isolados bacterianos ajustados para a absorvância de 0,6, foram selecionados quatro deles. Estes isolados apresentavam mortalidade larval e pupal maiores que a testemunha e valores de UFC/mL menores que 10<sup>8</sup> células/mL. Os isolados que se adequaram a estas especificações foram Epi 07, Epi 09, Epi 14 e Nim 11. No experimento seguinte, os quatros isolados selecionados tiveram sua concentração ajustada para uma absorvância de 0,8, visando aumentar a quantidade de inóculo e concentração e eficiência da bactéria sobre *S. frugiperda*.

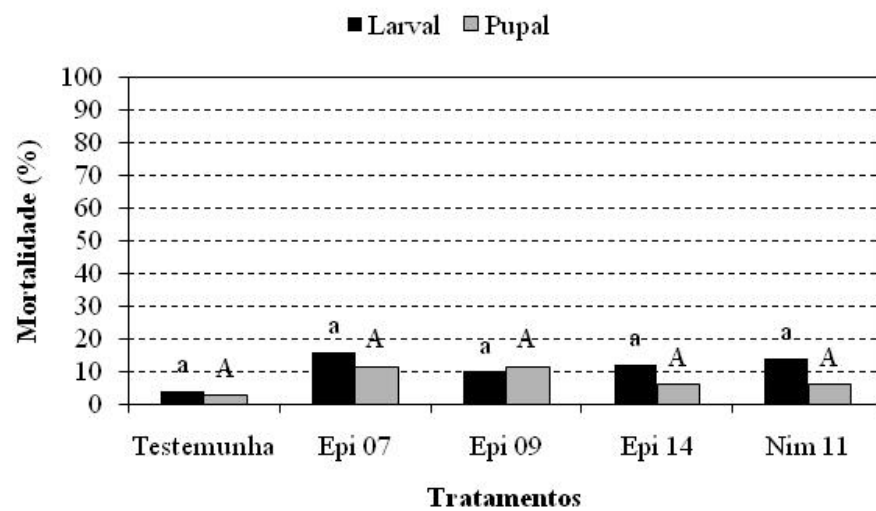
#### 4.2 Virulência de bactérias isoladas de *Azadirachta indica* sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda*

O ajuste da absorbância para o valor de 0,8 permitiu que os quatro isolados selecionados fossem comparados em concentrações que variaram de  $1,0 \times 10^8$  a  $5,0 \times 10^8$  UFC/mL (Tabela 4).

**TABELA 4.** Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) obtidas a partir de suspensões bacterianas isoladas de plantas de nim, *Azadirachta indica* ajustadas para 0,6 e 0,8 de absorbância.

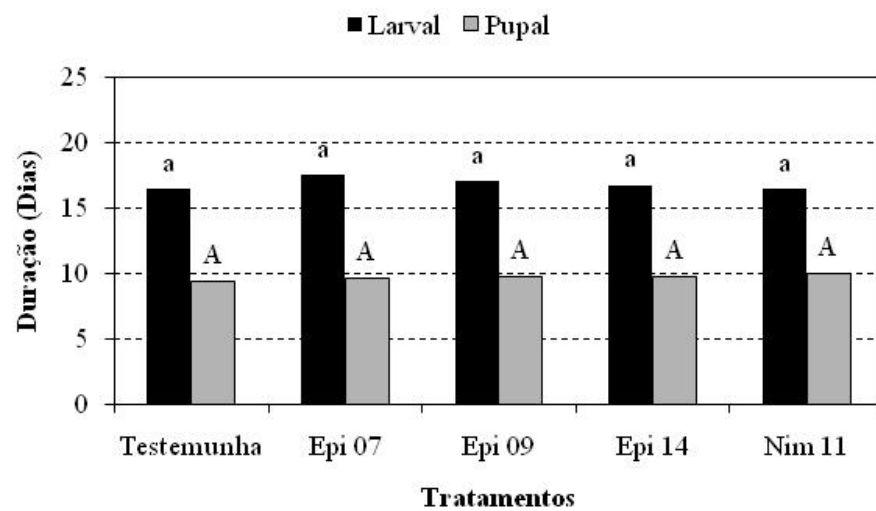
Isolados	Absorbância de 0,6	Absorbância de 0,8
Epi 07	$2,9 \times 10^6$	$1,4 \times 10^8$
Epi 09	$1,9 \times 10^6$	$4,8 \times 10^8$
Epi 14	$3,8 \times 10^5$	$0,9 \times 10^8$
Nim 11	$8,6 \times 10^6$	$3,3 \times 10^8$

A mortalidade larval e a pupal, a duração larval e a pupal e a deformação de pupas e de adultos de *S. frugiperda* não foram afetadas significativamente pela ingestão de folhas de milho tratadas com as suspensões bacterianas (Figuras 3, 4 e 5).



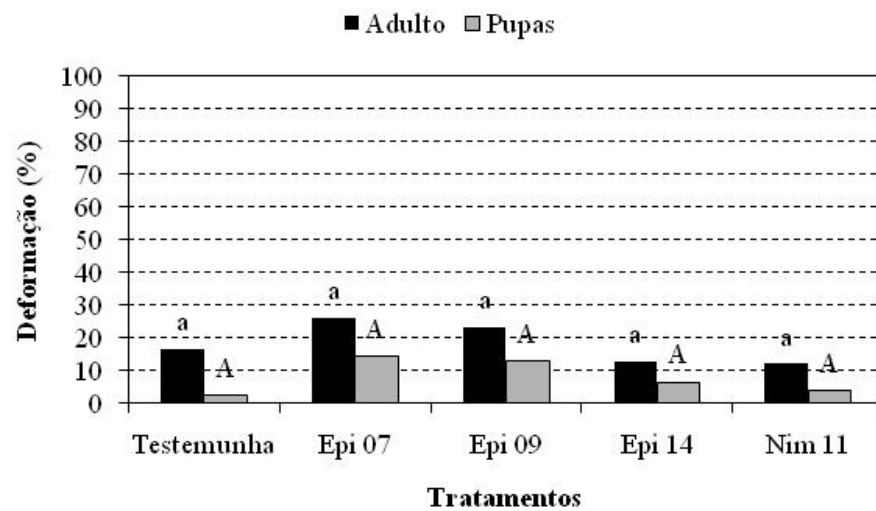
\*Medias seguidas de mesma letra, nas barras, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade.

**FIGURA 1.** Mortalidade larval (%) e pupal (%) de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas com suspensões bacterianas isoladas de plantas de nim, *Azadirachta indica*.



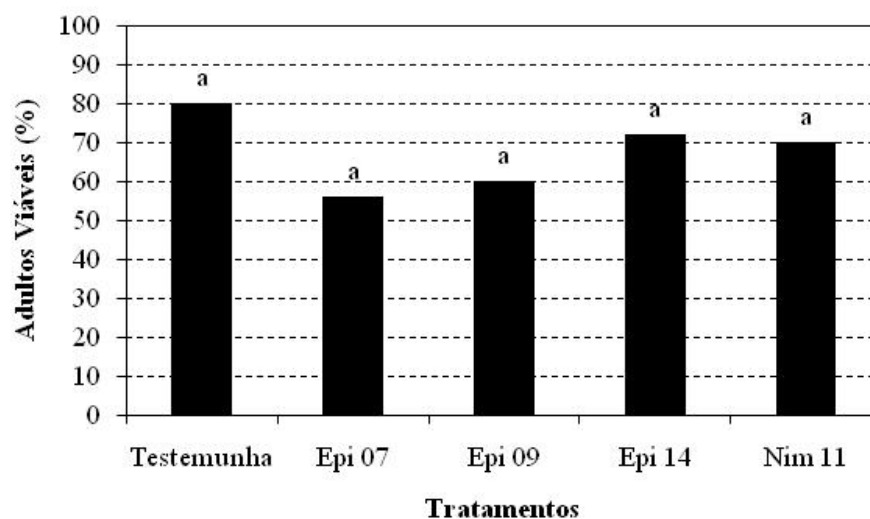
\*Medias seguidas de mesma letra, nas barras, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade.

**FIGURA 2.** Duração larval (dias) e pupal (dias) de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas com suspensões bacterianas isoladas de plantas de nim, *Azadirachta indica*.



\*Medias seguidas de mesma letra, nas barras, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade.

**FIGURA 3.** Deformação de pupas (%) e adultos (%) de *Spodoptera frugiperda*, provenientes de lagartas alimentadas com folhas de milho tratadas com suspensões bacterianas isoladas de plantas de nim, *Azadirachta indica*.



\*Medias seguidas de mesma letra, nas barras, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade.

**FIGURA 4.** Porcentagem de adultos viáveis de *Spodoptera frugiperda*, provenientes de lagartas alimentadas com folhas de milho tratadas com suspensões bacterianas isoladas de plantas de nim, *Azadirachta indica*.

O ajuste das concentrações dos isolados Epi 07, Epi 09, Epi 14 e Nim 11 de 0,6 de absorvância (Tabelas 1, 2 e 4) para 0,8 de absorvância (Tabela 4 e Figuras 1, 2, 3 e 4) não fez com que essas bactérias apresentassem maior virulência às lagartas de *S. frugiperda*.

Valicente e Fonseca (2004), por exemplo, verificaram que concentrações de inóculo (na dose da toxina de  $500 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) maiores e períodos de exposição maiores do que 72 horas fizeram com que os isolados de *B. thuringiensis tolworthi* fossem mais eficientes a lagartas de *S. frugiperda*. Entretanto, Baum (1999) relata a dificuldade em se controlar lagartas de *S. frugiperda*, utilizando

bactérias, e justifica, explicando que existem diferenças entre os gêneros desses microrganismos.

Neste experimento não foi observado que o aumento na concentração do inóculo, através do aumento na absorvância, também aumentasse a mortalidade larval ou pupal do inseto ou afetasse mais intensamente as demais fases do ciclo biológico do inseto. Os isolados Epi 07, Epi 09, Epi 14 e Nim 11 foram reavaliados neste experimento, pois foram aqueles que provocaram as maiores mortalidades larvais e pupais em uma concentração de inóculo inferior a  $10^8$  (Tabela 1). A eficiência de controle demonstrada por esses isolados em uma concentração mais baixa, absorvância de 0,6 (Tabelas 1 e 2) pressupunha, possibilitaria, em outro experimento, realizado com uma absorvância de 0,8, provocasse um aumento na mortalidade larval e pupal do inseto. Para isso, as absorvâncias foram ajustadas de 0,6 para 0,8, não mais que isso, devido à dificuldade em se multiplicar essas bactérias em meio sólido. O isolado Epi 07 foi aumentado aproximadamente 48 vezes, o Epi 09 cerca de 252 vezes, o Epi 14 em torno de 231 vezes e o Nim 11 cerca de 38 vezes. Apesar disso, não foi observado aumento na eficiência de controle dos isolados sobre *S. frugiperda* (Figuras 1, 2, 3 e 4).

A idade em que as lagartas foram avaliadas, juntamente com a sua prévia alimentação em dieta artificial contendo antibiótico, como discutido no experimento anterior, pode ter afetado o desempenho destes isolados selecionados para o segundo experimento. Entretanto, o uso, nestes experimentos, de lagartas maiores, com 10 dias de idade, fez com que fosse constatada a ação dos isolados sobre o inseto nessas condições. Isso leva a crer que essas bactérias serão mais eficientes em causar a morte de lagartas menores, recém-eclodidas. Nessa idade no campo, esse inseto é mais facilmente controlado, visto que ainda não entrou no cartucho do milho, não sendo



necessárias as pulverizações com inseticida direcionadas para essa região da planta, como indicado para o controle dessa praga. Além disso, os isolados avaliados apresentaram efeito nocivo sobre as diferentes fases de desenvolvimento do inseto como, duração larval e pupal, peso de pupas macho e fêmea e deformação de adultos que é de suma importância para reduzir os danos causados pela praga no campo.

## 5 CONCLUSÃO

Todos os isolados bacterianos avaliados foram patogênicos a lagartas de *Spodoptera frugiperda*, à exceção das bactérias Endo 01 e Epi 14.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGROFIT. **Agrofit**: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: [http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 06 out. 2013.

ANDALÓ, V. *et al.* Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com agrotóxicos visando o controle da Cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, p. 463-467, 2004.

ALBERTO, R. N. *et al.* Avaliação de metabólitos de isolado endofítico de *Sapindus saponaria* no controle de patógenos. In: EPCC ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA – UNICESUMAR, 6., 2009. **Anais...** Disponível em: <[http://www.cesumar.br/epcc2009/anais/raiani\\_nascimento\\_alberto.pdf](http://www.cesumar.br/epcc2009/anais/raiani_nascimento_alberto.pdf)>., Acesso em: 17 out. 2011.

ALMEIDA G. D. *et al.* Determinação da concentração letal média (CL 50) de *Beauveria bassiana* para o controle de *Brevicoryne brassicae*. **Idesia (Chile)**, Arica, v. 25, n. 2, p. 69-72, 2007.

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

ARAVIND, R. *et al.* Screening of endophytic bacteria and evaluation of selected isolates for suppression of burrowing nematode (*Radopholus similis* Thorne) using three varieties of black pepper (*Piper nigrum* L.). **Crop Protection**, Kerala, v. 29, p. 318–324, 2010.

ARMSTRON, G. C. L. *et al.* Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Crop Science**, Madison, v.35, p.550-557, 1995.

AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.(Eds.). **Ecologia Microbiana**. EMBRAPA-CNPMA, 1998. p.117-137.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULLI, B.N; DESHMUKH, S.K. (Ed). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p.189-207,

AZEVEDO, J. L. *et al.* Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3 n. 1, p. 40-65, 2000.

AZEVEDO, J. L. *et al.* Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: Eds. SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Eds ). **Biociência: avanço na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p. 233-269.

BAI, C.; Yi, S. X.; DEGHEELE, D. The comparative potency of commercial *Bacillus thuringiensis* formulations to larvae of *Spodoptera exempta* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). **Parasítica**, Bélgica, v.48, n. 2, p. 35-42, 1992.

BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 6, p. 996-1001, 2010a.

BARROS, E. M. *et al.* Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, New Brunswick, v. 137, p. 237-245, 2010b.

BARRY, B. D. *et al.* Performance of transgenic corn hybrids in Missouri for insect control and yield. **Journal of Economic Entomology**, Columbia, v. 93, n. 3, p. 991-999, 2000.

BATISTA, A. *et al.* **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Spodoptera frugiperda***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 19 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, n. 81)

BAUM, A. B.; JOHNSON, T. B.; CARLTON, B. C. *Bacillus thuringiensis*: Natural and recombinant biopesticide products. **Methods in Biotechnology: Biopesticides: use and delivery**, New Jersey, v. 5, p.189-209, 1999.

BEVILACQUA, A. H. V.; SUFFREDINI, I. B.; BERNARDI, M. M. Toxicidade de Neem, *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), em *Artemia* sp: comparação da preparação comercial e do óleo puro. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, São Paulo, v. 26, n. 2, p.157-160, 2008.

BOHOROVA, N. *et al.* Selection and characterization of Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* active against four major lepidopteran maize pests. **BioControl**, Dordrecht, v. 41, p. 153-156, 1996.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. Comissão Técnica Nacional de Biosegurança (CTNBio). **Parecer Técnico N° 1.100/2007**. Brasília, DF: Secretaria da CTNBio, 2008. p. 14.

BUSATO, G. R. *et al.* Susceptibility of caterpillars of the biotypes corn and rice of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) to insecticides with different action manners. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n.1, p. 15-20, 2006.

BUNTIN, G. D. *et al.* Evaluation of YieldGard transgenic resistance for control of fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) on corn. **Florida Entomologist**, Florida, v.84, n.1, p. 37-42, 2001.

BUTT, B. A.; CANTU, F. **Sex determination of lepidopterous pupae**. Washington: USDA, 1962. 7 p.

CAPINERA, J. L. **Encyclopedia of entomology**. 2<sup>nd</sup>. ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2008. v. 1- 4. 4346 p.

CAMPOS, A. P.; BOIÇA JUNIOR, A. L. Lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) submetidas a diferentes concentrações de óleo de nim. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Londrina, v.11, n. 2, p. 137-144, 2012.

CARDOSO, A. M. S. **Caracterização fisiológica de isolados bacterianos obtidos de *Azadirachta indica* e de bananeira ‘prata-anã’**. 2012. 57 p.. Monografia (Trabalho de conclusão de curso) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2012.

CARVALHO, G. A. *et al.* Eficiência do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) no controle de *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) e *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) em couve-manteiga *Brassica oleracea* Linnaeus var. acephala. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, p.181-186, 2008.

CESSA, R. M. A.; MELO, E. P.; JUNIOR, I. S. L. Mortalidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepdoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas de milho e feijoeiro imersas em soluções contendo inseticidas. **Revista Agrogeoambiental**, Pouso Alegre, v. 5, n. 1, p. 85-92, 2013.

CHOCOROSQUI, V. R. **Bioecologia de *Dichelops (Diceraeus) melacanthus* (Dallas, 1851) (Homoptera: Pentatomidae)**, danos e controle em soja, milho e

**trigo no norte do Paraná.** 2001. 160 p. Tese (Doutorado em Ciências)-  
Universidade Federal do Paraná - UFPR. Curitiba, 2001.

CLAYDON, N.; GROVE, J. F.; POPE, M. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. **Phytochemistry**, Washington v. 24, p. 937-943, 1985.

COSTA, E. L. N.; SILVA, R. F. P.; FIUZA, L. M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. **Acta Biológica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 26, p. 173-185, 2004.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho.** Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1995. 45 p. (Circular Técnica, n. 21).

CRUZ, I. **Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith).** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. 15 p. (Documentos 21)

CRUZ, I. Manejo de pragas da cultura do milho. In: CRUZ, J. C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHAES, P. C. (Ed.). **A Cultura do Milho.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. cap.12. p.303-362

CRUZ, I. *et al.* Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminum saturation. **International Journal of Pest Management**, London, v.45, p. 293-296, 1999.

CRUZ, I.; MONTEIRO, M. A. R. **Controle biológico da lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum*.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. 4 p. (Comunicado Técnico)

CRUZ, I.; TURPIN, F. T. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estádios de crescimento da cultura de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 355-359, 1982.

CRUZ, I.; VALICENTE, F. H.; SANTOS, F. H. dos; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A. **Manual de identificação de pragas da cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA - CNPMS, 1997. p.71

CRUZ, I.; VIANA, P. A.; WAQUIL, J. M. **Manejo das pragas iniciais de milho mediante o tratamento de sementes com inseticidas sistêmicos**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1999. 39 p. (Circular Técnica 31).

CRUZ, I. *et al.* Pragas: diagnóstico e controle. In: COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E. de. **Seja o doutor do seu milho**. 2º edição ampliada e modificada. Piracicaba: POTAFOS, 1995. p. 10-14

DIEZ-RODRIGUES, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 311-316, 2001.

DUTTON, A.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. Effects of Bt maize expressing Cry1Ab and Bt spray on *Spodoptera littoralis*. **Entomologia Experimentalis Applicata**, New Brunswick, v. 114, p. 161-169, 2005.

FERNANDES, O. D. *et al.* Efeito do milho geneticamente modificado mon810 sobre a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Londrina, v. 2, n. 2, p. 25-35, 2003.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**: Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA, 2010.

FIGUEIREDO, M. L. C.; DELLA LUCIA, T. M. C.; CRUZ, I. Effect of *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae) density on control of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) egg masses upon



release in maize field. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Londrina, v.1, n. 2, p. 12-19, 2002.

FRANÇA, I. W. B. *et al.* Efeitos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o Percevejo Predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, p.349-356, 2006.

GALLO, D. *et al.* **Entomologia agrícola**. Piracicaba-SP: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2002. 920 p.

GARCÍA, S. C. G. *et al.* Efecto del nim en el dano ocasionado por el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en tres variables agronomicas de maiz resistente y susceptible. **Acta Zoologica Mexicana** (nueva serie), Xalapa, v. 26, n.1, p. 1, Jan. 2010.

GASSEN, D.N. **Manejo de pragas associadas à cultura do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996. 134 p.

GAYNOR, D. L.; HUNT, W.F. The relationship between nitrogen supply, endophytic fungus and Argentine stem well resistance in ryegrass. **Proceedings of the New Zealand Grassland Association**, v. 44, p. 257-263, 1983.

GHINI, R.; KIMATI H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

GILL, S. S. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.90, n.1, p. 69-74, 1995.

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Columbia, v. 69, p. 488-497, 1976.

GRUTZMACHER, A. D.; MARTINS, J. F. da S.; CUNHA, U. S. da. Insetos-pragas das culturas do milho e sorgo no agroecossistema de várzea. In: PARFITT, J. M. B. **Produção de milho e sorgo em várzea**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000. p. 87-102.

HERNÁNDEZ, C. R.; VENDRAMIM, J. D. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Manejo Integrado Plagas**, Turrialba, n. 42, p. 14-22, 1996.

HOWATT, K. *Azadirachta indica*: one tree's arsenal against pests. Colorado: Colorado State University, 1994.

HUANG, F. *et al.* Survival of Kansas dipel-resistant European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on *Bt* and non-*Bt* corn hybrids. **Journal of Economic Entomology**, Columbia, v. 95, n. 3, p. 614-621, 2002.

JACOBSON, M. Botanical pesticides: past, present and future. In: ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R.; MORAND, P. **Insecticide of plant origin. ACS Symposium series - American Chemical Society**, Baltimore, v. 387 p. 69-77, 1989.

JAMES, C. Executive Summary of Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. **International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA)**, Ithaca, n. 43, 2011.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM crops**: ISAAA Brief 37-2007. Ithaca: ISAAA, 2007. 120 p.

KELLER, M. *et al.* Digestion of delta -endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to Cry1C. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Manhattan, v. 26, p. 365-373, 1996.

LIMA, M. P. L. *et al.* Bioatividade de formulações de nim (*Azadirachta indica* A. Juss, 1797) e de *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1381-1389, 2010.

LYNCH, R. E. *et al.* Management of corn earworm and fall armyworm (Lepdoptera: Noctuidae) injury on a sweet corn hybrid expressing a Cry1A(b) gene. **Journal of Economic Entomology**, Columbia, v. 92, n. 5, p. 1217-1222, 1999.

LINDOW, S. E.; BRANDL, M.T. Microbiology of the Phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 1975-1883, 2003.

LOUREIRO E. S.; MOINO JUNIOR A. Patogenicidade de Fungos Hifomicetos aos Pulgões *Aphis gossypii* Glover e *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 5, p. 660-665, 2006.

MACHADO, V.; FÍUZA, L. M. Evolução e manejo da resistência de insetos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 11, n. 38, p. 68-57, 2009.

MAREDA, K. M.; SEGURA, O. L.; MIHM, J. A. Effects of neem, *Azadirachta indica*, on six species of maize insect pests. **Tropical Pest Management**, London, v. 38, p. 190-195, 1992.

MARIANO, R. L. R. *et al.* Mecanismos de ação de bactérias promotoras de crescimento. In: MARIANO, R.L.R. (Coord.). **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Editora Universitária, 2000. p. 139-151

MARINHO A. M. R.; MARINHO P. S. B.; RODRIGUES FILHO E. Esteróides produzidos por *Penicillium herquei*, um fungo endofítico isolado dos frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 7, p.1710-1712, 2009.

MARTINS, J. F. S.; AFONSO, A. P. S. **Importância econômica de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) como praga do arroz no Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 31 p.

MARTINS, G. L. M. *et al.* Efeito de alguns inseticidas sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Dichelops* sp. Homoptera: Pentatomidae) na fase inicial da cultura do milho. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, v. 5, n. 09, 2006.

MARTINEZ, S.S. **O nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 2002. 142 p.

MAZZONETTO, F; VENDRAMIM, J. D. Efeito de pós de origem vegetal sobre *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleptera: Bruchidae) em feijão armazenado. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, p. 145-149, 2003.

MENDES, S. M. *et al.* Respostas da lagarta-do-cartucho a milho geneticamente modificado expressando a toxina Cry 1A(b). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 3, p. 239-244, 2011.

MEREGE, W. H. **Milho** (*Zea mays* L.). Disponível em:  
<<http://www.agrobyte.com.br/milho.htm>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

MESQUITA, A. Lavoura furada. Agro. In: JAKUBASZKO, R. O Ataque das lagartas. **Agro DBO**, São Paulo, v. 9, n. 42, p. 66, 2013.

MEYERS, H. B. *et al.* Survival of *Helicoverpa zea* Boddie on Bollgard cotton. BELT WIDE COTTON CONFERENCE., 1997, New Orleans. **Proceedings...** Memphis: National Cotton Council, 1997. v. 2. p.1269-1271.

MICHELOTTO, M. D. *et al.* Interação entre transgênicos (*Bt*) e inseticidas no controle de pragas-chave em híbridos de milho-safrinha. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.1, p.71-79, 2011.

MOREIRA, M. D. *et al.* Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. In: VENSON, M.; PAULA JÚNIOR, T. S.; PALLINI, A. (Eds.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG/CTZM, 2005. p. 89-120.

NG, S.; DAVIS, F. M.; WILLIAMS, W. P. Survival, growth, and reproduction of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) as affected by resistant com genotypes. **Journal of Economic Entomology**, Columbia, v. 78, n. 4, p. 967-971, 1985.

NAGOSHI R, N. Can the amount of corn acreage predict fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) infestation levels in nearby cotton? **Journal of Economic Entomology**, Columbia, v. 102, p. 210-218, 2009.

OLIVEIRA, M. S. S. *et al.* Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 326-331, 2007.

OMOTO, C. *et al.* Bases for insecticides resistance management of *Spodoptera frugiperda* in corn in Brazil. In: International Congress of Entomology, 21. Foz do Iguaçu. **Abstracts**. Londrina: Embrapa Soja (Embrapa Soja. Documentos, 143), v.1, p. 347, 2000.

ORSI, C. **Área plantada com transgênicos no mundo multiplica-se 100 vezes em 17 anos**. Disponível em < <http://www.inovacao.unicamp.br/destaques/area-plantada-com-transgenicos-no-mundo-multiplica-se-100-vezes-em-17-anos>>. Acesso em: 09 set. 2013.

OWNLEY, B. H. *et al.* *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York , v. 98, p. 267–270, 2008.

PAPA, G. **Lagarta-do-cartucho do milho**: Difícil controle. Ilha Solteira, 03 jan. 2006. Agro Negócios. Disponível em: <<http://www.ilhasolteira.com.br/colunas/index.php?acao=verartigo&idartigo=1136320313>>. Acesso em: 28 out. 2013.

PAPA, G. Manejo integrado de pragas. In: ZAMBOLIM, L.; CONCEIÇÃO, M.Z.; SANTIAGO T. **O que engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários**. Viçosa: UFV, 2003. p. 203-233.

PARRA, J. R. J. *et al.* **Controle biológico no Brasil**: Parasitóide e predadores. São Paulo: Manole, 2002. 635 p.

PAULA, C. S. *et al.* Dinâmica de parasitóides de *Spodoptera frugiperda* em milho convencional e em milho geneticamente modificado. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 9, São Lourenço. **Anais...** São Paulo: SEB, 2009. p. 1-4.

PEREIRA, L. G. B. **Táticas de controle da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda***. Belo Horizonte: Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais: 2007. 28 p (Dossiê Técnico).

PIETRANTONIO, P. V.; FEDERICI, B. A.; GILL, S. S. Interaction of *Bacillus thuringiensis* endotoxins with the insect midgut epithelium. In: THOMPSON, S.N.; FEDERICI, B.A. (Ed.) **Parasites and pathogens of insects**. New York: Academic Press, 1993. v.2. cap.3. p.55-79.

PIMENTEL, I. C.; FIGURA, G.; AUER, C. G. Fungos endofíticos associados a acículas de *Pinus taeda*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 1, p. 85-88, 2010.

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

POLANCZYK, R. A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**. 2004. 158 p. Tese (doutorado - entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. B. Biological parameters of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) assayed with *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 5, p. 464-468, Sept./Oct. 2005.

POLANCZYK, R. A. *et al.* Efeito de *Beauveria bassiana* (bals.) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) sorokin nos parâmetros biológicos de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1412-1416, nov./dez. 2010.

PRAÇA, L. B.; SILVA NETO, S. P.; MONNERAT, R. G. ***Spodoptera frugiperda* J. Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) Biologia, amostragem e métodos de controle**. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 22 p.

PRADO, S. S. *et al.* Vetores potenciais. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, v. 5, n. 62, p.24-27, 2004.

PRASIFKA, J. R. *et al.* Development and feeding of fall armyworm on *Miscanthus x giganteus* and switchgrass. **Jornal da Economic Entomology**, Annapolis, v. 102, p. 2154-2159, 2009.

PRATES, H. T.; VIANA, P. A.; WAQUIL, J. M. Atividades de extratos aquosos de folhas de nim (*Azadirachta indica*) sobre *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 3, p. 437-439, 2003.

RAMACHADRAN, R. *et al.* Behavioral responses and sublethal effects of spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) and fall webworm (Lepidoptera: Arctiidae) larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin in diet. **Environmental Entomology**, Columbia, v. 22, n. 1, p. 197-211, 1993.

ROEL, A. R. A agricultura orgânica ou ecológica e a sustentabilidade da agricultura. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, Campo Grande, v. 3, n. 4, p. 57-62, 2002.

ROEL, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, Campo Grande, v. 1, n. 2, p. 43-50, 2001.

ROEL, A. R. *et al.* The effect of sub-lethal doses of *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil on the midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 54, n. 3, p. 505-510, 2010.

ROEL, A. R. *et al.* Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* (Swartz) (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, p. 799-808, 2000.

ROSA, A. P. A. da. *et al.* Biologia e tabela de vida de fertilidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em linhagens de milho. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.1, p.39-45, 2012.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa-MG: UFV, 2001. 279 p.



ROSENHEIM, J. A.; HOY, M. A. Intraspecific variation in levels of resistance in field populations of a parasitoid, *Aphis melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae): the role of past selection pressures. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 79, p. 1161-1173, 1986.

SÁ, V. G. M. *et al.* Sobrevivência e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuide) em hospedeiros alternativos. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, p. 108-115, 2009.

SALAMA, H. S. *et al.* Development of some lepidopterous cotton pests as affected by exposure to sublethal levels of endotoxins of *Bacillus thuringiensis* for different periods. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 38, p. 220-229, 1981.

SANTIAGO, G. P. *et al.* Efeitos de extratos de plantas na biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) mantida em dieta artificial. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 792-796, 2008.

SILOTO, R. C. **Danos e biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho.** 2002, 105 p. Dissertação (Mestrado - Entomologia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SILVIE, P. *et al.* **Manual de identificação das pragas, e seus danos no algodoeiro.** 1. ed. Cascavel: COODETEC/CIRAD-CA, 2001. 100 p. (Boletim Técnico n. 34)

TAVARES, W. S. *et al.* Selective effects of natural and synthetic insecticides on mortality of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its predator *Eriopsis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, New York, v. 45, n. 6, p. 557-561, 2010.

TROTEL-AZIL, P. *et al.* Characterization of new bacterial control agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. Mediating grapevine resistance against *Botritis cinerea*. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 64, p. 21-32, 2008.

VALICENTE, F. H. **Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Bacillus thuringiensis***. Sete lagoas: EMBRAPA Milho e sorgo, 2008. p. 65. (Circular técnica 105)

VALICENTE, F. H.; FONSECA, M. M. Suscetibilidade da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*, a diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*. **Revista Brasileira de milho e sorgo**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 21-29, 2004

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*. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n.1, p. 69-74, 2003.

WEBBER, J. A. A natural control of Dutch elm disease. **Nature**, London, v. 85, p. 195-2002, 1983.

ZHANG, X. *et al.* Insecticidal effect of recombinant endophytic bacterium containing *Pinellia ternata* agglutinin against white backed planthopper, *Sogatella furcifera*. **Crop Protection**, Kerala, v. 30, p.1-7, 2011.