

**UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ**

**Larissa de Carvalho**

**AVALIAÇÃO DE VIRULÊNCIA DE 81 ISOLADOS DE  
BACTÉRIAS PARA LARVAS DE *Spodoptera Frugiperda*  
(J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

**Taubaté – SP**

**2021**

**Larissa de Carvalho**

**AVALIAÇÃO DE VIRULÊNCIA DE 81 ISOLADOS DE  
BACTÉRIAS PARA LARVAS DE *Spodoptera frugiperda*  
(J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Trabalho de graduação apresentado ao Departamento de Ciências Agrárias da Universidade de Taubaté como requisito para obtenção do título de Engenheira Agrônoma.  
Área de Concentração: Entomologia Agrícola  
Orientador: Prof. Doutora Adriana Mascarette Labinas

**Taubaté – SP**

**2021**

**Grupo Especial de Tratamento da Informação - GETI  
Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBi  
Universidade de Taubaté - UNITAU**

C331a Carvalho, Larissa de  
Avaliação de virulência de 81 isolados de bactérias para  
larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera:  
Noctuidae). / Larissa de Carvalho. -- 2021.  
37 f. : il.

Monografia (graduação) - Universidade de Taubaté,  
Departamento de Ciências Agrárias, 2021.  
Orientação: Profa. Dra. Adriana Mascarette Labinas.  
Departamento de Ciências Agrárias.

1. Controle biológico. 2. Lagarta-do-cartucho. 3. Manejo  
integrado de pragas. 4. Bactéria. I. Universidade de Taubaté.  
Departamento de Ciências Agrárias. Curso de Agronomia. II.  
Título.

CDD – 579.3

**LARISSA DE CARVALHO**

**AVALIAÇÃO DE VIRULÊNCIA DE 81 ISOLADOS DE BACTÉRIAS PARA  
LARVAS DE *Spodoptera frugiperda*  
(J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: Noctuidae)**

Trabalho de graduação apresentado ao  
Departamento de Ciências Agrárias da  
Universidade de Taubaté como requisito para  
obtenção do título de Engenheira Agrônoma.  
Área de Concentração: Entomologia Agrícola  
Orientador: Prof. Doutora Adriana Mascarette  
Labinas

Data: 16/11/2021

Resultado: APROVADO

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr<sup>a</sup>. Adriana Mascarette Labinas

UNITAU

-----

Prof. Dr. Marcos Roberto Furlan

UNITAU

-----

Prof. Dr. Paulo Fortes Neto

UNITAU

-----

À minha amada filha Alice, por ter me dado uma  
razão para recomeçar e muitas para continuar.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço imensamente a Deus por todas as chances que me foram dadas, por todas as lições que me foram ensinadas e por todos os sonhos que Ele me permitiu sonhar.

À minha mãe, Anésia, por ter me ensinado a ser forte, resiliente e por ter me ajudado em todo meu caminho até aqui.

À minha filha Alice, por todo o amor, companheirismo e inspiração para os sonhos em buscar um mundo melhor onde ela possa habitar com alegria.

À minha professora e orientadora Adriana, por ter acreditado em mim desde o início, me concedendo aprendizado e oportunidades que irei honrar.

A todos meus professores que me ensinaram com paixão e me mostraram uma nova forma extraordinária de enxergar a natureza.

À minha tia Helenice, por todos os conselhos inspiradores e por ter me mostrado o caminho correto em todas as bifurcações que encontrei em minha vida.

A meu amado Daniel, por segurar minha mão nos momentos difíceis, por me incentivar e acreditar incondicionalmente em mim, por me ensinar quão belo é o amor que guia os sonhos.

À minha amiga Aline, por toda a ajuda no desenvolvimento do trabalho, por todo o companheirismo e momentos vividos com alegria e leveza.

À minha querida Cauane, por sempre estar ao meu lado me incentivando, ajudando e me mostrando quão bela pode ser a simplicidade da existência.

Aos amigos de classe, Eduardo e Jailton, pelo companheirismo e por terem me ajudado pacientemente nas matérias em que eu precisava melhorar.

A meus mentores no estágio, Luís Garrigós Leite, Maria Elízia e Fernando Baldo, que me ajudaram, ensinaram e conduziram em todas as etapas do experimento, e ao Instituto Biológico de Campinas pela oportunidade de aprendizado.

A todos que me ajudaram, ensinaram e fizeram parte do meu caminho até aqui.

“A natureza com seus caprichos e mistérios, condensa em pequenas coisas o poder de dirigir as grandes, nas sutis a potência de dominar as mais grosseiras, nas coisas simples a capacidade de reger as complexas.”

Ana Maria Primavesi

## RESUMO

*Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) é um inseto-praga de alta ocorrência no Brasil. Ataca diversas culturas de interesse agrônomo, sendo praga chave do milho, causando impacto direto na produtividade. Sua principal forma de controle é o químico, porém, a busca por meios sustentáveis de controle de pragas é cada vez mais expressiva, demonstrando uma importante área de pesquisa e desenvolvimento, sendo o controle biológico um meio para este fim. Baseado nisso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a virulência de 81 isolados de bactérias em larvas de *Spodoptera frugiperda* nas fases L2/L3. O estudo foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado. Na primeira etapa foram avaliados os 81 isolados crescidos em meio de cultura *Nutrient Broth* em concentração à 100%, contendo 3 repetições com 5 lagartas cada. Os isolados que resultaram em mortalidade acima de 90% foram submetidos à segunda etapa para serem reavaliados em diluição a 10%, contendo 6 repetições com 5 lagartas cada. A avaliação da eficiência de cada tratamento foi feita por meio da contagem diária de lagartas mortas. Para obtenção da porcentagem de mortalidade total, foram consideradas as lagartas mortas após 7 dias. Dos 81 isolados avaliados, 22 atingiram mortalidade acima de 90%, mesmo diluídos à 10%. Destes, os isolados 459b<sup>12</sup>; 427b; 365BNp6; 365BNg8; 268 e 321b atingiram 100% de mortalidade em apenas 72h, demonstrando alta taxa de mortalidade em um menor período. Os resultados iniciais obtidos demonstram que essas bactérias podem ser potenciais agentes de controle, podendo-se constituir nas bases de diversos produtos biológicos em um mercado com demanda crescente.

Palavras-chave: Controle Biológico, Lagarta-do-Cartucho, Manejo Integrado de pragas, Bactérias

## ABSTRACT

*Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) is a pest insect of high occurrence in Brazil. It attacks several species of agronomic interest, being a key pest of corn, causing direct impact on productivity. Its main form of control is the chemical one, however, the search for complementary means of pest control is increasingly expressive, demonstrating an important area of research and development, being the biological control a means to this end. Based on it, the present work aimed to evaluate the virulence of 81 isolates of bacteria in *Spodoptera frugiperda* larvae in L2/L3 stages. The study was carried out in a Completely randomized design. In the first step, 81 isolates were evaluated growing in Nutrient Broth culture medium, at 100% concentration, with 3 replicates and 5 larvae on each. The isolates that resulted in mortality above 90% were submitted to the second stage to be reevaluated in 10% dilution, containing 6 repetitions with 5 larvae on each. The evaluation of the efficiency of each treatment was handling by daily counting of dead larvae. To obtain the percentage of total mortality, we considered the dead larvae after 7 days. Of the 81 isolates evaluated, 22 reached mortality rates above 90%, even when diluted at 10%. Of these, the isolates 459b<sup>12</sup>; 427b; 365BNp6; 365BNg8; 268 and 321b reached 100% mortality in only 72h, demonstrating a high mortality rate in a shorter period. The initial results obtained show these bacteria can be potential control agents and can become the basis of several biological products in a market with increasing demand.

Keywords: Biological Control, Lagarta-do-Cartucho, Integrated Pest Management, Bacteria.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Meio Nutrient Broth sendo pesado para diluição .....	16
Figura 2 - Inoculação do meio de cultura Nutrient Broth com os isolados selecionados .....	17
Figura 3 - Meio de cultura inoculado sob agitação 1600 rpm .....	17
Figura 4 - Dieta artificial fechada.....	18
Figura 5 - Corte prévio da dieta artificial.....	18
Figura 6 - Higienização da pinça para montagem de experimento .....	19
Figura 7 - Larvas na fase L2/L3 no recipiente inicial .....	19
Figura 8 - Recipientes contendo dieta e 5 larvas cada .....	20
Figura 9 - Frascos contendo água deionizada para serem autoclavados .....	22
Figura 10 - Recipientes contendo dieta e frascos com diluição .....	23
Figura 11 - Bioensaio montado em câmara Fitotron.....	23
Figura 12 – Exemplo de comparação entre crescimento das lagartas .....	27

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Bioensaio 1: Mortalidade (%) de lagartas após 7 dias em tratamentos com fermentado bacteriano em concentração à 100%.....	25
Tabela 2 - Bioensaio 2: Mortalidade (%) de lagartas após 7 dias em tratamentos com fermentado bacteriano em concentração à 100% .....	26
Tabela 3 - Bioensaio 3: Mortalidade (%) de lagartas após 7 dias em tratamentos com fermentado bacteriano em concentração à 100% .....	28
Tabela 4 - Bioensaio 4: Mortalidade de lagartas a cada 24h, total de lagartas mortas após 7 dias e porcentagem de mortalidade total (%) em tratamentos com fermentado bacteriano em concentração à 10% .....	29

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>12</b>
2.1	Desenvolvimento e hábitos da lagarta.....	14
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
3.1	Bioensaio 1 .....	15
3.2	Bioensaio 2 .....	20
3.3	Bioensaio 3 .....	21
3.4	Bioensaio 4 .....	21
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Conhecida popularmente como lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) é um inseto polífago de grande ocorrência no Brasil, especialmente, em áreas agrícolas produtivas. É praga chave do milho, porém ataca diversas outras espécies de interesse agrônômico, causando-lhes impacto direto na produtividade.

Os grandes danos provocados por essa espécie-praga costumam ser amenizados, principalmente, por meio da utilização do método de controle químico de pragas, porém, a utilização inadequada desta tecnologia e sem o rigor de boas práticas agrônômicas pode, eventualmente, resultar em populações de insetos resistentes,, em diminuição da frequência de organismos não-alvos, como parasitoides e predadores levando a um desequilíbrio biológico, além de permitir o surgimento de pragas secundárias (BARROS et al., 2006).

A busca por outros métodos de controle de pragas é cada vez mais expressiva e neste cenário, o método de controle biológico vem se destacando. O mercado de inseticidas biológicos tem demanda crescente e um dos principais meios de controle biológico de *Spodoptera frugiperda* é por meio do uso de bactérias entomopatogênicas. (KLOEPPER et al., 1997)

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a taxa de mortalidade causada por 81 isolados de bactérias no controle de lagartas de 2<sup>o</sup>/3<sup>o</sup> instar de *Spodoptera frugiperda*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

*Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie de lepidóptera amplamente distribuída no Brasil devido às condições climáticas favoráveis, que são alta temperatura e baixa umidade relativa do ar. Apresenta preferência alimentar por gramíneas como trigo, sorgo, arroz, milheto, grama-bermuda e cana-de-açúcar, sendo a principal praga do milho no Brasil, tendo ataques relatados desde a emergência da planta até o aparecimento das espigas, comprometendo significativamente a produção podendo causar perdas de até 60%, necessitando alto investimento para seu controle. (CRUZ et al., 2020). O milho é cultivado em todas as regiões do país, tendo grande importância na agricultura brasileira sendo o segundo maior exportador de milho no mundo (USDA, 2020).

Além das gramíneas, *S. frugiperda* também ataca plantas de outras famílias como, por exemplo, alfafa, feijão, amendoim, batata, batata-doce, repolho, espinafre, tomate, couve, abóbora, soja, algodão (BOTTON et al., 1998; CRUZ, 1995; SILVA et al., 1968), acelga, alcachofra, alface, almeirão, berinjela, cebola, chicória, maracujá, melão, pêssago, pimentão e quiabo (BOREGAS et al., 2009; SILVA et al., 1968), entre outras. Também tem importância no México, América Central e América do Sul. (CRUZ, 1995).

Uma das causas da sua alta ocorrência se dá devido a oferta de hospedeiros ao longo do ano como, por exemplo, soja, milho e algodão, além de sucessão de culturas como o sorgo e o milho safrinha. Pode se alojar também em plantas de cobertura, como o milheto e plantas daninhas e voluntárias, favorecendo a permanência da praga entre os cultivos.

Tendo disponibilidade de alimento constantemente, a praga se demonstra frequente, inclusive em culturas em que foi descrita como secundária (NAGOSHI, 2009). *S. frugiperda* é uma importante praga agrícola, não só devido ao seu alto dano em diversas culturas, mas, também, pela dificuldade de controle, citaram Melo et al. (2014).

Os grandes danos provocados por essa espécie-praga são amenizados, principalmente, por meio da utilização do método de controle químico de pragas, porém o uso incorreto, sem orientação técnica e conhecimentos básicos para o manejo, como dinâmica populacional, planos de amostragens e nível de controle, pode oferecer riscos ao meio ambiente e às populações, podendo ocasionar

problemas como danos à saúde dos agricultores; presença de resíduos de agrotóxicos acima do permitido em alimentos consumidos *in natura*, seleção de populações de insetos resistentes às substâncias dos produtos, o que leva ao uso repetido e elevado; compostos que podem se acumular no ambiente; causar prejuízos a grupos de organismos não-alvo como parasitoides e predadores; provocar eventuais contaminações do solo e corpos hídricos, entre outros. (BARROS et al., 2006; BRAVO et al., 2011; LU et al. 2019; CAMPANINI et al., 2012).

Como alternativa aos efeitos gerados por esses compostos, há a necessidade da adoção ou combinação de outras práticas de controle de pragas que sejam economicamente viáveis, visando menores impactos ambientais e sociais (PESSOA et al., 2014). Um dos pilares do Manejo Integrado de Pragas – MIP, é o controle biológico que consiste no uso de predadores e inimigos naturais para a realização do controle de uma praga. Vírus, bactérias, fungos, parasitoides e nematoides são exemplos de inimigos naturais de *S. frugiperda* (WAGUIL et al, 2020), gerando sustentabilidade e viabilidade ecológica no agrossistema (WRIGHT, 2006).

Bactérias do gênero *Bacillus* tem sido amplamente utilizadas no controle biológico de diversas formas, como controle de doenças, fungos, antagonismo contra fitopatógenos, associação com crescimento, controle de diversos insetos pragas, indução de resistência, entre outros potenciais usos na agricultura (KLOEPPER et al., 2004; KIM et al., 2003; RAGAZZOSÁNCHEZ et al, 2011).

Os esporos produzidos por *Bacillus* spp. são estruturas termotolerantes ao frio e ao calor, resistentes à dessecação, à radiação ultravioleta e aos solventes orgânicos, condições extremas de pH, aos pesticidas, fertilizantes e ao tempo de estocagem. Essas características são desejáveis à formulação de produtos para o biocontrole de insetos-praga (KLOEPPER et al., 1997).

O uso de *Bacillus* spp. no controle biológico já é amplamente utilizado, com pesquisas constantes acerca do assunto, porém, outras bactérias também podem demonstrar virulência contra insetos-pragas, sendo necessária pesquisas e testes para novas descobertas.

## 2.1 Desenvolvimento e hábitos da lagarta

O desenvolvimento de *S. frugiperda* é o holometabólico, o que compreende as fases de ovo, larva, pupa e adulto. Cada fêmea ovípara entre 200 à 300 ovos nas folhas das plantas hospedeiras, podendo esse número chegar até 2000. Após a oviposição a fêmea cobre os ovos com pelos e escamas retiradas do próprio corpo. Os ovos no início são rosa claros e com estrias radiais, se tornando cinzas de 3 a 7 dias antes da eclosão (MOREIRA e ARAGÃO, 2009).

As lagartas recém-eclodidas produzem um fio em seus primeiros estádios e os usam para distribuir-se entre as plantas, podendo apresentar uma distribuição uniforme na lavoura (SANTOS, 2008). É denominado silking quando as larvas apenas se penduram, e ballooning quando são levadas pelo vento. (ZALUCKI et al 2002; MOORE e HANKS 2004).

A lagarta eclode possuindo 1,5 mm de comprimento e no último instar pode chegar a atingir 40 mm de comprimento com uma coloração que varia de esverdeada a pardo-escura. (GALLO et al., 2002). Após eclodirem, as larvas passam por seis a sete estágios, até chegar à vida adulta, em seu completo desenvolvimento (SARMENTO et al., 2002).

O ciclo larval varia de doze a trinta dias em temperaturas entre 18,8 à 30°C (SARMENTO et al., 2002), após esse período, as lagartas entram no solo para empupar (GALLO et al., 2002). As pupas são formadas em 8-10 dias, medindo de 14 a 18mm, possuem cor marrom-avermelhada e podem ser encontradas a poucos centímetros de profundidade do solo. O ciclo de desenvolvimento, desde ovo até a fase adulta dura de 20 a 60 dias, variando de acordo com as condições climáticas.

Os insetos Adultos são mariposas noturnas de até 4cm de envergadura, possuem as asas anteriores cinza escuras e posteriores cinza claras. (MOREIRA e ARAGÃO, 2009). Machos e fêmeas apresentam coloração acinzentada e o macho possui um ponto dourado na asa anterior. São insetos de hábito noturno e mais ativos em noites quentes (VALICENTE et al., 2015).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Controle Biológico - Instituto Biológico - Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal, com sede em Campinas, São Paulo. 22°54'24.1"S 47°00'56.5"W.

Foram selecionadas 81 isolados pertencentes ao Banco de Bactérias do Laboratório de Controle Biológico, do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal, do Instituto Biológico do Estado de São Paulo. Os isolados são provenientes de coletas realizadas por diferentes pesquisadores em várias regiões do Brasil, além de isolados adquiridos de outros locais que são utilizados na produção *On farm*.

Foram realizados 4 bioensaios (1,2,3 e 4), os ensaios de 1 a 3 foram um screening inicial do Banco de Bactérias e obedeceram a mesma metodologia com o objetivo de determinar quais dos isolados selecionados, em fermentado bacteriano em concentração total inicial, apresentavam virulência em lagartas de *S. frugiperda* na fase L2/L3. Para estes bioensaios (de 1 a 3) seguiu-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, contendo 3 repetições por tratamento.

Os isolados que apresentaram mortalidade superior à 90% foram selecionados para o Bioensaio 4 para nova verificação da virulência, com metodologia semelhante, apenas se diferenciando na concentração do fermentado bacteriano, que foi diluído a 10% em água e no número de repetições, que foram 6.

Para fins de identificação dos tratamentos de todos os bioensaios, de 1 a 4, decidiu-se trazer a numeração original dos isolados obtidos no Banco de Bactérias ao número correspondente do tratamento em cada bioensaio.

#### 3.1 Bioensaio 1

Para o bioensaio 1 foram selecionados os seguintes isolados, seguidos do seu número correspondente como tratamentos (T): 399a"(T1) - 387ª(T2) - 105(T3) - 332a'(T4) - 133b'(T5) - 552b(T6) - 137b(T7) - 735b(T8) - 523b(T9) - 626b(T10) - 739b(T11) - 332a"(T12) - 387d(T13) - 1b"(T14) - 387b(T15) - 742c(T16) - 151b(T17) - 557a'(T18) - 365b<sup>1-1</sup>(T19).

Inicialmente, foi realizado o cultivo e a fermentação dos isolados bacterianos e para isso, previamente, foi preparado o meio de cultura líquido Nutrient Broth (NB),

com 800mL de água deionizada medida em uma proveta e 6,4g de Nutrient Broth pesado em balança (Figura 1), na proporção de 8g para cada Litro de água que foram misturados em um Becker até a completa diluição. Em seguida, foram colocados 40mL do meio de cultura em frascos tipo reagente com 100mL de capacidade para serem autoclavados, totalizando 20 frascos (19 para receberem os isolados e um para ser o controle positivo com meio de cultura puro), o segundo controle positivo era água deionizada autoclavada).

Figura 1 - Meio Nutrient Broth sendo pesado para diluição



Fonte: A autora, 2021.

Após a autoclavagem e o resfriamento, os frascos tipo reagente, contendo o meio de cultura Nutrient Broth (NB), foram levados à capela de fluxo laminar, previamente limpa, para a etapa da inoculação, isto é: a transferência de 100µL de cada isolado (Figura 2). Após a inoculação, os frascos tipo reagente foram colocados sob agitação constante, à 1600 RPM, por 72 horas, para o crescimento e cultivo dos isolados (Figura 3).

Figura 2 - Inoculação do meio de cultura Nutrient Broth com os isolados selecionados



Fonte: A própria autora, 2021.

Figura 3 - Meio de cultura inoculado sob agitação 1600 rpm

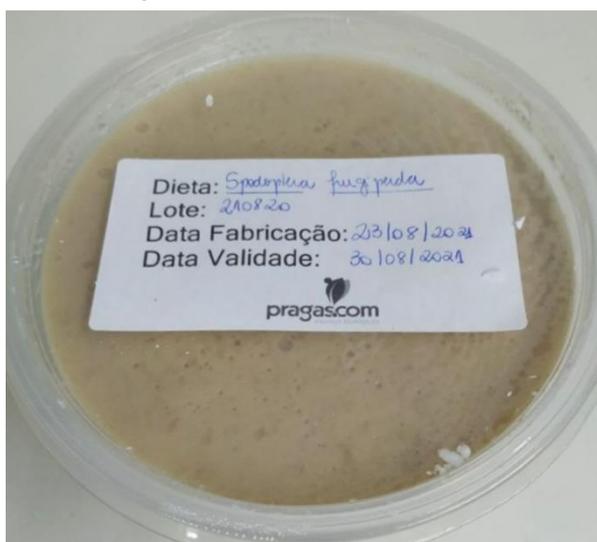


Fonte: A própria autora, 2021.

Após um período de 72 horas, se verificava se o meio de cultura se encontrava turvo, confirmando que as bactérias haviam se multiplicado. Em seguida, os frascos tipo reagente, contendo o fermentado bacteriano, eram levados à capela da câmara de fluxo laminar, previamente limpa, para realização da imersão da dieta artificial.

A dieta artificial foi adquirida de um fornecedor local idôneo (Figura 4), juntamente com as lagartas. Antes da montagem do bioensaio, a dieta artificial foi levada à capela da câmara de fluxo laminar e, com o auxílio de um boleador e de um bisturi, eram retirados discos de dieta e acertadas as bordas (Figura 5). Para o armazenamento dos discos de dieta artificial, foram utilizados tubos tipo Falcon, previamente autoclavados. Após fechados, os tubos Falcon eram colocados em um saco autoclavado e lacrados para serem levados à geladeira até a utilização.

Figura 4 - Dieta artificial fechada



Fonte: A própria autora, 2021.

Figura 5 - Corte prévio da dieta artificial



Fonte: A própria autora, 2021.

Na montagem do bioensaio, com auxílio de uma pinça, os discos de dieta artificial, previamente cortados, foram submersos por 30 segundos no fermentado bacteriano, sendo posteriormente colocados em recipientes plásticos com capacidade de 100mL que foram identificados e mantidos parcialmente abertos até a evaporação do excesso de umidade, o mesmo procedimento foi adotado para os dois controles positivos.

Após o contato da pinça com o líquido, essa era limpa em álcool 90 e queimada na chama do bico de Bunsen, para completa desinfecção (Figura 6), impedindo que a bactéria de um tratamento entrasse em contato com os outros.

Figura 6 - Higienização da pinça para montagem de experimento



Fonte: A própria autora, 2021.

Após a evaporação do excesso de umidade da dieta mergulhada no líquido, com o auxílio de um pincel de cerdas finas e macias, foram retiradas do recipiente original larvas de *Spodoptera frugiperda* (Figura 7), que foram colocadas nos recipientes contendo dieta tratada (Figura 8).

Figura 7 - Larvas na fase L2/L3 no recipiente inicial



Fonte: A própria autora, 2021.

Figura 8 - Recipientes contendo dieta e 5 larvas cada



Fonte: A própria autora, 2021.

Os tratamentos foram acondicionados em câmara climática, tipo Fitotron, a  $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa do ar  $50 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12 horas. A avaliação da mortalidade era realizada diariamente, durante 7 dias subsequentes. Foram considerados eficientes e aptos para serem incluídos no bioensaio 4, os tratamentos que causaram índice de mortalidade acima de 90%.

O tratamento 19 (isolado 365b<sup>1-1</sup>) foi avaliado e possuía mais de uma bactéria, as quais foram novamente isoladas e testadas separadamente como T43(365B.N.p.6), T47(365 B.N.g.8) e T50 (365 c.P.7).

### 3.2 Bioensaio 2

A metodologia do bioensaio 2 foi exatamente a mesma do bioensaio 1, apenas mudando a quantidade total de isolados testados que, neste caso, foram 30: ma08(T20) - 749a'(T21) - 447b(T22) - mm13(T23) - 54a(T24) - 459b''<sup>2</sup>(T25) - 133b''(T26) - 287<sup>a</sup>(T27) - *Bacillus subtilis*(T28) - *Chromobacterium*(T29) - *Pseudomonas fluorescens*(T30) - 518b\*(T31) - 750b''(T32) - 729b''(T33) - *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki(T34) - *Saccharopolyspora spinosa*(T35) - 427b(T36) - 311a(T37) - mm05(T38) - 399a'(T39) - 750a(T40) - 742d'(T41) - 556b'(T42) - 365B.N.p.6(T43) - 189b'''(T44) - 365a(T45) - 328a'(T46) - 365 B.N.g.8(T47) - *Bacillus thuringiensis tenebrionis*(T48) - ma07(T49) - 365 c.P.7(T50).

Para cada tratamento foram realizadas, também, 3 repetições, cada um contendo 5 lagartas, totalizando 15 lagartas por tratamento e 480 lagartas no total. Foram preparados 31 frascos contendo meio de cultura líquido Nutrient Broth (30 para receberem os isolados e um para receber o controle positivo de meio de cultura puro), o segundo controle positivo era água deionizada e autoclavada.

O tratamento 447b (T22) foi inconclusivo pois parte das lagartas sumiram, não se sabendo assim se foi fuga, canibalismo ou a mortalidade da bactéria em si, portanto ele foi repetido no bioensaio 4.

### **3.3 Bioensaio 3**

A metodologia do bioensaio 3 foi exatamente a mesma do bioensaio 1 e 2, apenas mudando a quantidade de isolados testados, totalizando-se 29: 137a"(T51) - 328a"(T52) - 74a(T53) - 189b'(T54) - 729b'(T55) - 328b(T56) - 735a"(T57) - 399b(T58) - 556b"(T59) - 418<sup>a</sup>(T60) - 531a"(T61) - 189b<sup>2</sup>(T62) - 160b(T63) - 381<sup>a</sup>(T64) - 729c"(T65) - 742a(T66) - 194b(T67) - 186a'(T68) - 518b#(T69) - 102b(T70) - 120b(T71) - 102a(T72) - 739a"(T73) - 742d"(T74) - 74b<sup>2</sup>(T75) - 111b'(T76) - 195a(T77) - 56c(T78) - 365B.P.g5(T79).

Para cada tratamento foram realizadas, também, 3 repetições, cada um contendo 5 lagartas, totalizando 15 lagartas por tratamento e 465 lagartas no total. Foram preparados 30 frascos contendo meio de cultura líquido Nutrient Broth (29 para receberem os isolados e um para receber o controle positivo de meio cultura puro), o segundo controle positivo era água deionizada e autoclavada.

### **3.4 Bioensaio 4**

Neste Bioensaio foram selecionados os 27 isolados que apresentaram mortalidade acima de 90% nos bioensaios 1, 2 e 3. Outros dois novos isolados, também, foram incluídos: os números 268 (T80) e 321b (T81). O isolado 447b (T22) foi reincluído pois, parte das lagartas, na primeira vez, sumiram (por fuga, canibalismo ou ação das bactérias), o que tornou o seu resultado inconclusivo.

Como um produto comercial não seria viável para comercialização em altas concentrações (devido ao custo de produção, transporte e armazenamento), o

bioensaio 4 foi realizado com diluição do fermentado bacteriano em água, reduzindo sua concentração para, apenas, 10%.

Foram realizados 28 tratamentos, sendo 27 contendo os isolados e 1 controle positivo. Nesse ensaio foram utilizadas 6 repetições com 5 larvas cada, resultando em 30 larvas por tratamento e totalizando 840 larvas adquiridas.

Os isolados com alta taxa de mortalidade resultantes dos bioensaios 1, 2 e 3 foram: 387a(T2) - 749a'(T21) - 447b(T22) - 54a(T24) - 459b''(T25) - *Chromobacterium*(T29) - 518b\*(T31) - *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*(T34) - 427b(T36) - 311a(T37) - mm05(T38) - 750a(T40) - 742d'(T41) - 365BNp6(T43) - 189b'''(T44) - 365BNg8(T47) - *Bacillus thuringiensis tenebrionis*(T48) - 137a''(T51) - 74a(T53) - 556b''(T59) - 531a''(T61) - 189b''(T62) - 742a(T66) - 194b(T67) - 739a''(T73) - 268(T80) - 321b(T81).

O corte prévio da dieta e o cultivo e fermentação dos isolados bacterianos foi realizado tal como fora descrito para os bioensaios de 1 a 3.

Para a realização da diluição do fermentado bacteriano foi utilizada água deionizada que foi previamente preparada. A medição de 90mL por tratamento foi realizada com o auxílio de uma proveta, sendo colocada em frascos de vidro que foram fechados com duas camadas de papel alumínio e amarrados com barbante (Figura 9). Os frascos fechados foram colocados dentro de sacos autoclaváveis também lacrados, para então passarem pelo processo de autoclavagem.

Figura 9 - Frascos contendo água deionizada para serem autoclavados



Fonte: A própria autora, 2021.

Em seguida, os frascos contendo o fermentado bacteriano e os frascos contendo a água deionizada autoclavada foram levados a capela da câmara de fluxo laminar previamente limpa para realização da diluição. Com o auxílio de uma pipeta

volumétrica foram retirados de cada tratamento 10mL do fermentado bacteriano que foram diluídos nos 90mL de água deionizada autoclavada com devida identificação (Figura 10). O mesmo foi feito com o controle positivo, que não possuía nenhum inoculo, sendo meio de cultura Nutrient Broth puro.

Após a diluição de todos os tratamentos, a submersão dos discos de dieta artificial e introdução das lagartas seguiu a mesma metodologia descrita anteriormente, sendo levado a câmara Fitotron (Figura 11).

Figura 10 - Recipientes contendo dieta e frascos com diluição



Fonte: A própria autora, 2021.

Figura 11 - Bioensaio montado em câmara Fitotron



Fonte: A própria autora, 2021.

Por se tratar dos isolados mais virulentos nos bioensaios, foi realizada nova preservação dessas bactérias para que possam ser utilizadas posteriormente. O meio de cultura inoculado já fermentado, que foi utilizado para a diluição à 10%,

inicialmente teve apenas 10mL retirados de seu conteúdo total de 40mL. O restante foi aproveitado para a preservação. Foram utilizados tubos criogênicos contendo 1,8mL de isolado e 400 $\mu$ L de glicerol autoclavado que foram medidos com auxílio de pipeta volumétrica. Os tubos foram devidamente identificados e armazenados em freezer a -20°C.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da eficiência de cada tratamento por meio da contagem diária de lagartas mortas consta nas Tabelas 1, 2, 3 e 4. Para obtenção da porcentagem de mortalidade total, foram consideradas as lagartas mortas após 7 dias.

Tabela 1 – Bioensaio 1: Mortalidade (%) de lagartas após 7 dias em tratamentos com fermentado bacteriano em concentração à 100%.

Tratamento	Mortalidade (%)
399a"	73,33
387a	100,00
105	60,00
332a'	73,33
133b'	60,00
552b	46,66
137b	53,33
735b	66,66
523b	60,00
626b	66,66
739b	60,00
332a"	73,33
387d	80,00
1b"	66,66
387b	73,33
742c	66,66
151b	53,33
557a'	66,66
365b <sup>1-1</sup>	100,00
MC	20,00
Água	26,66

Fonte: A própria autora, 2021.

De acordo com a Tabela 1, no Bioensaio 1, dois dos 19 isolados testados apresentaram 100% de mortalidade das lagartas, sendo eles os isolados 387a e 365b<sup>1-1</sup>. Os tratamentos considerados como controles positivos demonstraram baixa mortalidade, sendo o meio de cultura pura (MC) com 20% de mortalidade e a água deionizada pura (água) com 26,66% de mortalidade.

O isolado 365b<sup>1-1</sup> foi plaqueado e após o crescimento da bactéria foi verificada se havia contaminação, havendo três diferentes colônias de bactérias. Estas foram novamente isoladas e testadas separadamente como 365B.N.p.6, 365 B.N.g.8 e 365 c.P.7 no Bioensaio 2 (Tabela 2).

Tabela 2 - Bioensaio 2: Mortalidade (%) de lagartas após 7 dias em tratamentos com fermentado bacteriano em concentração à 100%

Tratamento	Mortalidade (%)
ma08	0,00
749a'	100,00
447b	33,33
mm13	0,00
54a	100,00
459b <sup>2</sup>	100,00
133b"	66,66
287a	33,33
<i>Bacillus subtilis</i>	0,00
<i>Chromobacterium</i>	100,00
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	86,66
518b*	100,00
750b"	80,00
729b"	46,66
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki	100,00
<i>Saccharopolyspora spinosa</i>	66,66
427b	100,00
311a	100,00
mm05	93,33
399a'	60,00
750a	100,00
742d'	100,00
556b'	53,33
365B.N.p.6	100,00
189b <sup>3</sup>	100,00
365a	26,66
328a'	46,66
365 B.N.g.8	100,00
<i>Bacillus thuringiensis tenebrionis</i>	100,00
ma07	60,00
365 c.P.7	0,00
MC	0,00
ÁGUA	0,00

Fonte: A própria autora, 2021.

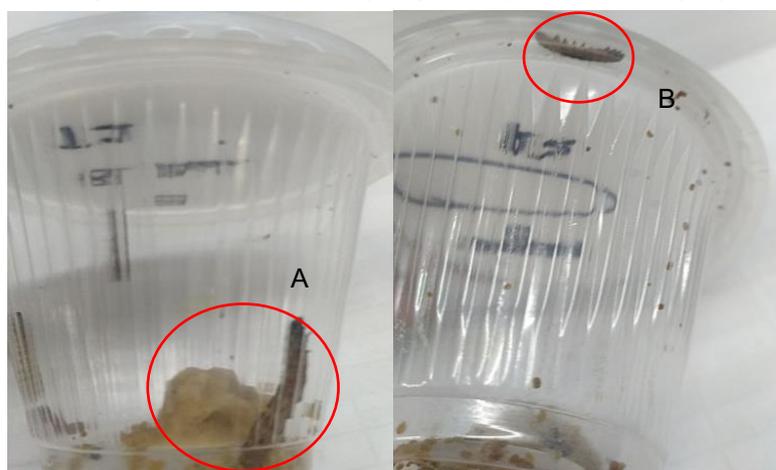
Considerando os resultados da Tabela 2, no Bioensaio 2, quinze dos 31 isolados resultaram em mortalidade acima de 90% em 7 dias, sendo eles os isolados: 749a<sup>1</sup>; 54a; 459b<sup>2</sup>; *Chromobacterium*; 518b<sup>\*</sup>; *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki; 427b; 311a; mm05; 750a; 742d<sup>1</sup>; 365B.N.p.6; 189b<sup>3</sup>; 365 B.N.g.8; *Bacillus thuringiensis tenebrionis*. Os tratamentos considerados como controles positivos não demonstraram mortalidade, sendo 0% tanto para o meio de cultura puro (MC) quanto para a água deionizada pura. Os isolados ma08, mm13, *Bacillus subtilis* e 365 c.P.7 também não obtiveram mortalidade.

Este Bioensaio resultou em maior taxa de mortalidade pois os tratamentos foram escolhidos com base em testes anteriores que foram realizados para outros insetos tendo potencial virulência comprovada.

O isolado 447b teve um resultado inconclusivo pois parte das lagartas sumiram, não se sabendo se foi fuga, canibalismo ou mortalidade da bactéria. Ele foi repetido no Bioensaio 4 (Tabela 4).

O tratamento com *Bacillus subtilis* resultou em um efeito inesperado, causando crescimento exagerado das lagartas e as tornando aparentemente maiores em comparação aos controles positivos (Figura 12).

Figura 12 – Exemplo de comparação entre crescimento das lagartas  
Figura A (*Bacillus subtilis*); Figura B (testemunha Água)



Fonte: A própria autora, 2021

Tabela 3 - Bioensaio 3: Mortalidade (%) de lagartas após 7 dias em tratamentos com fermentado bacteriano em concentração à 100%

Tratamento	Mortalidade (%)
137a"	100,00
328a"	20,00
74a	93,33
189b'	86,66
729b'	46,66
328b	20,00
735a"	33,33
399b	86,66
556b"	100,00
418a	66,66
531a"	100,00
189b" <sup>2</sup>	100,00
160b	33,33
381a	33,33
729c"	33,33
742a	93,33
194b	100,00
186a'	40,00
518b#	40,00
102b	40,00
120b	6,66
102a	6,66
739a"	93,33
742d"	33,33
74b" <sup>2</sup>	40,00
111b'	46,66
195a	46,66
56c	40,00
365B.P.g <sup>5</sup>	46,66
268	6,66
MC	0,00
ÁGUA	0,00

Fonte: A própria autora, 2021

De acordo com a Tabela 3, no Bioensaio 3, oito dos 30 isolados testados apresentaram acima de 90% de mortalidade das lagartas, sendo eles os isolados: 137a"; 74a; 556b"; 531a"; 189b"<sup>2</sup>; 742a; 194b; 739a". Os tratamentos considerados como controles positivos não demonstraram mortalidade, sendo 0% tanto para o meio de cultura puro (MC) quanto para a água deionizada pura.

Os tratamentos que apresentaram acima de 90% de mortalidade das lagartas nos bioensaios de 1 a 3 foram selecionados para o Bioensaio 4 para avaliação em fermentado bacteriano diluído a 10%. Os resultados constam na Tabela 4.

Tabela 4 - Bioensaio 4: Mortalidade de lagartas a cada 24h, total de lagartas mortas após 7 dias e porcentagem de mortalidade total (%) em tratamentos com fermentado bacteriano em concentração à 10%

tratamento	Mortalidade (horas)							Total	Mortalidade total (%)
	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h		
387a	0	5	22	3	0	0	0	30	100,00
749a'	1	1	2	2	7	11	5	29	96,66
447b	0	1	1	2	2	4	3	13	43,33
54a	0	1	4	15	7	3	0	30	100,00
459b" <sup>2</sup>	0	24	6	0	0	0	0	30	100,00
<i>Chromobacterium</i>	0	2	2	6	0	8	5	23	76,66
518b**	0	2	0	7	2	9	1	21	70,00
Btk	0	9	13	8	0	0	0	30	100,00
427b	1	16	13	0	0	0	0	30	100,00
311a	0	2	2	3	10	10	2	29	96,66
mm05	0	2	5	0	4	8	2	21	70,00
750a	0	0	1	10	12	7	0	30	100,00
742d'	0	3	2	3	13	9	0	30	100,00
365BNp6	0	22	8	0	0	0	0	30	100,00
189b" <sup>3</sup>	0	4	8	6	6	5	0	29	96,66
365BNg8	0	22	8	0	0	0	0	30	100,00
Btt	0	1	2	4	14	9	0	30	100,00
137a"	0	0	6	8	8	8	0	30	100,00
74a	0	1	1	1	5	6	6	20	66,66
556b"	0	3	4	8	13	2	0	30	100,00
531a"	0	3	3	7	14	3	0	30	100,00
189b" <sup>2</sup>	0	2	3	12	12	1	0	30	100,00
742a	0	2	1	7	7	9	3	29	96,66
194b	0	2	5	10	11	2	0	30	100,00
739a"	0	1	3	6	13	7	0	30	100,00
268	0	21	9	0	0	0	0	30	100,00
321b	0	23	7	0	0	0	0	30	100,00
CP	0	1	0	1	1	0	2	5	16,66

Fonte: A própria autora, 2021

De acordo com a Tabela 4, no bioensaio 4, vinte e dois dos 27 isolados resultaram mortalidade acima de 90%, mesmo diluídos à 10%, sendo eles os isolados: 387a; 749a'; 54a; 459b"<sup>2</sup>; *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* (Btk); 427b;

311a; 750a; 742d'; 365B.N.p.6; 189b'''; 365B.N.g.8; *Bacillus thuringiensis tenebrionis* (Btt); 137a''; 556b''; 531a''; 189b''.<sup>2</sup>; 742a; 194b; 739a''; 268; 321b.

O controle positivo (CP) resultou em apenas 16,66% de mortalidade.

Para este Bioensaio também foi demonstrada a mortalidade das lagartas sendo medida em horas (24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h e 168h). A população inicial de larvas era de 30 em cada tratamento.

Os isolados 459b''<sup>2</sup>; 427b; 365BNp6; 365BNg8; 268 e 321b atingiram 100% de mortalidade em 72h, tendo a maioria das larvas mortas em 48h, demonstrando melhor controle de lagartas em menos tempo.

Os tratamentos 387a e *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* (Btk) atingiram 100% de mortalidade em 96h, tendo o ápice da mortalidade em 72h.

Os tratamentos 54a; 750a; 742d'; *Bacillus thuringiensis tenebrionis* (Btt); 137a''; 556b; 531a''; 189b''<sup>2</sup>; 194b e 739a'' atingiram 100 de mortalidade em 144h com o ápice de mortalidade variando para cada tratamento, tendo um resultado tardio em comparação com os tratamentos mencionados anteriormente.

O isolado 189b'''' atingiu 96,66 de mortalidade em 144h e os isolados 749a', 311a e 742a atingiram este nível mortalidade em 168h, tendo um resultado inferior em comparação aos anteriores, tanto em relação ao tempo quanto em número de indivíduos mortos. Os isolados 447b; *Chromobacterium*; 518b\*; mm05 e 74a não atingiram mortalidade satisfatória.

Um importante fator a se levar em consideração é o tempo em que um tratamento leva para causar a mortalidade das lagartas. O alimento contaminado precisa ser ingerido e dissolvido no intestino até começar a agir. Portanto, mesmo infectadas, as lagartas causam danos nas folhas até morrerem. Por este motivo os isolados 459b''<sup>2</sup>, 427b, 365BNp6, 365BNg8, 268 e 321b se demonstraram efetivos, causando alta mortalidade em um menor período, sendo promissores para continuidade de pesquisa.

Produtos comerciais contendo *Bacillus thuringiensis* já são amplamente disseminados, sendo os mais utilizados no controle de *S. frugiperda*. Essa tecnologia é amplamente estudada tanto para o desenvolvimento de inseticidas biológicos quanto no uso de engenharia genética para o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas. Porém, já foi observada em populações de *S. frugiperda* resistência à proteína Cry1F (STORER et al., 2010; FARIAS et al., 2014). Isso

demonstra a necessidade da procura de novas linhagens bacterianas para se evitar o aumento de populações resistentes.

## 5 CONCLUSÃO

Já é conhecida a eficiência de bactérias para mortalidade de larvas de lepidópteros e outros insetos, sendo utilizados como base de inseticidas microbiológicos. Os resultados iniciais obtidos demonstram que essas bactérias podem ser potenciais agentes de controle, podendo-se constituir nas bases de diversos produtos biológicos em um mercado com demanda crescente. Mais testes e pesquisas devem ser realizados nesta área para correta identificação, isolamento e dosagem para um controle efetivo, demonstrando a importância da pesquisa e desenvolvimento nesta área.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, R.; DEGRANDE P. E.; RIBEIRO J. F.; RODRIGUES A. L. L.; NOGUEIRA R. F.; FERNANDES M. G. **Flutuação populacional de insetos predadores associados a pragas do algodoeiro**. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 57-64, jan./mar. 2006. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V73\\_1/barros.PDF](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V73_1/barros.PDF)>. Acesso em: 17 Jul. 2021.

BOTTON, M.; CARBONARI, J. J.; GARCIA, M. S.; MARTINS, J. F. S. **Preferência alimentar e biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em arroz e capim arroz**. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 207-212, 1998. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/S0301-80591998000200006>>. Acesso em: 15 Jul. 2021.

BOREGAS, K. G. B.; FERNANDES, G. W.; MENDES, S.M.; FERMINO, T. C.; WAQUIL, J. M. **Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos**. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 2009, São Lourenço. v. 9, p. 1-3. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0006-87052013000100009>>. Acesso em: 08 Ago. 2021.

BRAVO, A; LIKITVIVATANAVONG, S; GILL. S. S; SOBERÓN M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, p. 423-431, jul. 2011. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.ibmb.2011.02.006>>. Acesso em: 17 Jul. 2021.

CAMPANINI, E.B.; DAVOLOS C.C.; ALVES E.C.C; LEMOS, M.V.F. Caracterização de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de importantes insetos-praga da agricultura. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 3, p. 362-369, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0006-87052012000300007>>. Acesso em: 28 Jun. 2021.

CRUZ, I; VIANA, P.A.; WAGUIL, J. M. **Milho: Pragas da Fase Vegetativa e Reprodutiva**. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: <[https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/AG01\\_69\\_16820051120.html](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/AG01_69_16820051120.html)>. Acesso em: 25 Jun. 2021.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA CNPMS**, p. 45 1995.(EMBRAPA-CNPMS: Circular Técnica, 21). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/475779/a-lagarta-do-cartucho-na-cultura-do-milho>>. Acesso em: 20 Jun. 2021.

FARIAS, J. R.; ANDOW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; SORGATTO, R. J.; FRESIA, P.; SANTOS, A. C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, n. 2, p. 150-158, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.019>> Acesso em: 21 Jun. 2021.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Universidade de São Paulo, Piracicaba, v. 10, p.920. 2002. Disponível em: <[https://ocondedemontecristo.files.wordpress.com/2013/07/livro-entomologia-agric3adcola-\\_jonathans.pdf](https://ocondedemontecristo.files.wordpress.com/2013/07/livro-entomologia-agric3adcola-_jonathans.pdf)>. Acesso em: 05 ago. 2021.

KIM, H. S.; PARK, J. Y.; CHOI, S. W.; CHOI, K. H.; LEE, G. P.; BAN, S. J.; LEE, C. H.; KIM, C. S. Isolation and Characterization of Bacillus Strains for Biological control. **Journal of Microbiology**, v. 41, No. 3. p. 196-201. 2003. Disponível em: <[https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0142056279&origin=inward&txGid=7bbf1f9f1c748898c782ffec10791d68&featureToggles=FEATURE\\_VIEW\\_PDF:1](https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0142056279&origin=inward&txGid=7bbf1f9f1c748898c782ffec10791d68&featureToggles=FEATURE_VIEW_PDF:1)>. Acesso em: 04 Out. 2021.

KLOEPPER, J. W. **Current Status and Future Trends in Biocontrol Research and Development in the U.S.** In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CLEAN AGRICULTURE, 1997, Anais Simpósio. Japão, MONTEIRO, L. 1997, p. 49-52.

KLOEPPER, J. W. et al. **Nature and application of biocontrol microbes: Bacillus spp.** **American Phytopathological Society**, v. 94, n. 11, p.1259-1266, 2004.

LU, C., LU, Z., LIN, S., DAI, W., ZHANG, Q. 2020. Neonicotinoid insecticides in the drinking water system – Fate, transportation, and their contributions to the overall dietary risks. **Environ Pollut.** v. 258, n. 113722. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113722>>. Acesso em: 11 Jun. 2021.

MELO, E.P.; DEGRANDE, P.E.; JUNIOR, I.D.S.L.; SUEKANE, R.; KODAMA, C.; FERNANDES, M.G. Disposição espacial e injúrias da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 3, p. 343-349, mai/jun, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2014000300007>>. Acesso em: 10 set. 2021.

MOORE R.G., HANKS L.M. Aerial dispersal and host plant selection by neonate *Thyridopteryx ephemeraeformis* (Lepidoptera: Psychidae). **Ecol Entomol.** v. 29, p. 327-335. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.0307-6946.2004.00611.x>>. Acesso em: 22 Jul. 2021.

MOREIRA, H.J.C.; ARAGÃO, F.D. **Manual de pragas do milho**. FMC Chemical. Campinas, p. 68, 2009. Disponível em: <<https://www.agrolink.com.br/downloads/manual%20de%20pragas%20do%20milho.pdf>>. Acesso em: 11 set. 2021.

NAGOSHI R. N., 2009. Can the amount of corn acreage predict fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) infestation levels in nearby cotton?. **Econ Entomol.** v. 102, p. 210-218. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19253639>>. Acesso em: 09 set. 2021.

PESSOA, A.S. et al. **Bacillus thuringiensis Berliner e Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Erebidae) sob ação de extratos vegetais.** Arq. Inst. Biol,

v.81, n.4, p. 329-334, out. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1808-1657000962012>>. Acesso em: 03 Jul. 2021.

SÁNCHEZ, R. J. A.; CABRERA, A. R.; GONZÁLEZ, L. L.; SOLANO, G. L.; SANTOYO, M.C. Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. **Revista Chapingo. Serie horticultura**, v. 17, n. SPE1, p. 5–11, 2011. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/262598595\\_Seleccion\\_de\\_cepas\\_de\\_Bacillus\\_spp\\_productoras\\_de\\_antibioticos\\_aisladas\\_de\\_frutos\\_tropicales](https://www.researchgate.net/publication/262598595_Seleccion_de_cepas_de_Bacillus_spp_productoras_de_antibioticos_aisladas_de_frutos_tropicales)>. Acesso em: 22 Jul. 2021.

SANTOS, K.B. **Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas à *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) e *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: noctuidae)**. Dissertação (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, p. 91 2008. Disponível em:<[http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UEL\\_04bbc3c254195e4e538eb5bd8ba2712b](http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UEL_04bbc3c254195e4e538eb5bd8ba2712b)>. Acesso em:11 set. 2021.

SARMENTO, R.A.; AGUIAR, R.W.S.; AGUIAR, R.A.S.S.; VIEIRA, S.M.J.; OLIVEIRA, H.G.; HOLTZ, A.M. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**. v.18, n. 2, p. 41-48, 2002. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/viewFile/6418/4153>>. Acesso em: 23 out. 2021.

SILVA, A. G. A.; GONÇALVES, C. R.; GALVÃO, D. M.; GONÇALVES, A. J. L.; GOMES, J.; SILVA, N. M.; SIMONI, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil, seus parasitos e predadores**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1968. Tomo 1, parte II. 622 p.

SILVA, M. T. B. **Insetos-pragas: aspectos ecológicos, danos e controle**. In: Campos, B.C. de (Coord.). A cultura do milho no plantio direto. Cruz Alta: FUNDACEP/SENAR. Cap. 6. p.95-123. 1998.

STORER, N.P.; BABCOCK, J.M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G.D.; BING, J. W.; HUCKABA, R.M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 4, p. 1031- 1038, 2010. <<https://doi.org/10.1603/EC10040>>. Acesso em: 11 set. 2021.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Dados e Análises Culturas Agrícolas**. Disponível em: <<http://www.usdabrazil.org.br/pt-br/dados-e-analises/>> Acesso em: 12 set. 2021

WAGUIL, J.M.; VIANA, P. A.; CRUZ, I. **Manejo Integrado de Pragas**. In: AGEITEC: Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: <[https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONTAG01\\_69\\_16820051120.html](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONTAG01_69_16820051120.html)>. Acesso em: 04 set. 2021.

WRIGHT, M. G. Biological Control of Invasive Insect Pests. In: ABROL, D. P. (ed.) Integrated Pest Management - Current concepts and ecological perspective. San Diego: **Elsevier Academic Press**, v. 4, n. 3, p. 267-281. 2014. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/3868683>>. Acesso em: 22 Jul. 2021.

VALICENTE, F.H. **Manejo Integrado de Pragas na Cultura do Milho**. EMBRAPA, Circular técnica, v.1679-1150, n.8, p. 1-13, jun. 2015. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/125260/1/circ-208.pdf>>. Acesso em: 04 set. 2021.

ZALUCKI M.P., CLARKE A.R., MALCOLM S.B. Ecology and behavior of first instar larval Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**. v. 47, p. 361-393. 2002. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ento.47.091201.145220>>. Acesso em: 22 Jul. 2021.