



Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido

**AÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO NIM SOBRE ADULTOS  
DE *Spodoptera frugiperda***

**IRISLÉIA PEREIRA SOARES DE SOUSA**

**2019**

**IRISLÉIA PEREIRA SOARES DE SOUSA**

**AÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO NIM SOBRE ADULTOS DE *Spodoptera frugiperda***

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 Mestre.

**Orientadora**  
**Profa. Dra. Teresinha Augusta Giustolin**

**JANAÚBA-MG**  
**2019**

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

Sousa, Irlisleia Pereira Soares de

S725a      Ação de bactérias isoladas do Nim sobre adultos de *Spodoptera frugiperda* [manuscrito] / Irlisleia Pereira Soares de Sousa. – 2019.  
27 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, Universidade Estadual de Montes Claros – Janaúba, 2019.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. D. Sc. Teresinha Augusta Giustolin.

1. Bactérias. 2. Nim. 3. *Spodoptera frugiperda*. I. Giustolin, Teresinha Augusta. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.

CDD. 632.32

Catálogo: Joyce Aparecida Rodrigues de Castro Bibliotecária CRB6/2445

**IRISLÉIA PEREIRA SOARES DE SOUSA**

**AÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO NIM SOBRE ADULTOS DE *Spodoptera frugiperda***

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 Mestre.

**APROVADA em 29 de março de 2019.**

---

Profa. Dra. Teresinha Augusta Giustolin  
UNIMONTES (Orientadora)

---

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

---

Profa. Dra. Adélica Aparecida Xavier  
UNIMONTES (Conselheira)

---

Prof. Dr. Antônio Cláudio Ferreira da Costa  
EPAMIG (Conselheiro)

**JANAÚBA-MG  
2019**

A DEUS, porque sempre que olho para trás e vejo onde cheguei, eu vejo como ele cuidou de mim. Sem ele, eu não venceria tudo o que eu venci.

**Ofereço**

Aos meus amados pais, Jerônimo e Joventina, pelo esforço e dedicação.

Aos meus amados e abençoados filhos, Yuri e Mirelly, tudo que fiz foi por vocês e para vocês.

Ao meu esposo, companheiro e amigo, que sempre esteve ao meu lado com muita paciência, me incentivando e torcendo pelo meu sucesso.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre cuidar de mim me ensinando a caminhar e a perder meus medos e por nunca me deixar sozinha;

À UNIMONTES e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, pela oportunidade de realizar um grande sonho, a obtenção do título de mestre;

À CAPES – Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida;

À FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelo apoio financeiro a este projeto;

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dra. Teresinha Augusta Giustolin: sou eternamente grata pela disponibilidade de me orientar e ensinar, especialmente durante a redação desta dissertação, pela paciência, confiança, pelas conversas e conselhos;

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Clarice Diniz Alvarenga Corsato, pelas contribuições e sugestões na realização deste trabalho;

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Adélica Aparecida Xavier, pela participação na banca de defesa, por ceder os isolados bacterianos utilizados nessa dissertação e pela gentileza no laboratório de Fitopatologia;

Ao Pesquisador Dr. Antônio Cláudio Ferreira da Costa, pela participação na banca examinadora;

Aos meus amados pais Jerônimo e Joventina, que não mediram esforços para me educar e me proporcionar uma formação acadêmica;

Aos meus irmãos Consuelber e Rondinelly, por sempre torcerem pelo meu sucesso. Agradeço especialmente ao Consuelber, que me incentivou a voltar a estudar. Serei eternamente grata!

Aos meus queridos amigos Prof. Dr. José Augusto (Neto) e Helena, por sempre estarem ao meu lado me incentivando e torcendo pelo meu sucesso. Pelos momentos de alegrias e risos compartilhados e por estarem sempre presentes e dispostos a me ajudar;

Aos amigos do mestrado, Carlos Gustavo (Durok), Thaísa, Daniel, Naiara (Lab. Solos), Josiane (Lab. Sementes), Bruna (Lab. de Fitopatologia), pelo auxílio e disposição em me ajudar a superar minhas limitações sempre que precisei;

Ao meu esposo Rogério e aos meus amados filhos, Yuri e Mirelly, que no decorrer dessa caminhada foram meus pilares, onde pude me apoiar e me confortar nos momentos de angústia, aflição, choro e alegrias. Foi por vocês que não desisti!

A todos os amigos e familiares, que mesmo distantes torceram pela realização desse sonho.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	09
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2 INTRODUÇÃO DO ARTIGO .....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Cultivo das plantas de milho .....	16
3.2 Multiplicação dos isolados bacterianos .....	16
3.3 Obtenção de pupas de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	17
3.4 Fertilidade e fecundidade de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	18
4 RESULTADOS .....	19
5 DISCUSSÃO .....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

## RESUMO

Ação de bactérias isoladas do nim sobre adultos de *Spodoptera frugiperda*

O objetivo do trabalho foi avaliar a fecundidade e fertilidade de adultos de *Spodoptera frugiperda* após as lagartas ingerirem bactérias isoladas da planta nim, *Azadirachta indica*. Foram avaliados 11 isolados bacterianas e suas suspensões calibradas para a concentração de  $5,0 \times 10^8$  células/mL. A calibragem foi feita em espectrofotômetro que foi ajustado para 540 nm de densidade óptica. As suspensões foram utilizadas para tratar fragmentos de folhas de milho que foram oferecidos como alimento para as lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda*. As lagartas do controle receberam folhas de milho imersas em água. Com os adultos sobreviventes dessas lagartas foram constituídos casais que foram mantidos em gaiolas. Foram avaliadas a longevidade de machos e fêmeas, o período de pré-oviposição e fértil, o número de dias de oviposição, o total de posturas, a fecundidade e fertilidade das fêmeas. Do total de isolados avaliados, 64,0% deles causaram algum efeito adverso aos adultos, a ponto de afetarem uma ou mais das variáveis avaliadas. A ingestão das bactérias pelas lagartas reduziu a longevidade de adultos, macho e fêmea. As fêmeas tiveram redução no período fértil, no número de posturas, na fecundidade e na fertilidade. Somente o período de pré-oviposição não foi afetado. Foram entomopatogênicos aos adultos os isolados Epi 7 (*Bacillus pumilus*), Epi 9 (*Bacillus* sp.), Epi 12 (*Bacillus* sp.), Epi 13 (*Bacillus* sp.), Nim 8 (*Bacillus subtilis*), Nim 10 (*Bacillus* sp.) e Nim 12 (*Bacillus* sp.), pois, afetaram negativamente algumas das variáveis avaliadas. O isolado *Bacillus* sp. Epi 9 é o mais virulento aos adultos de *S. frugiperda*, pois afetou negativamente todas as variáveis avaliadas, a exceção período de pré-oviposição. Os resultados obtidos neste trabalho são promissores e importantes, pois este é o primeiro relato de bactérias isoladas de nim com ação patogênica a adultos de *S. frugiperda*.

**Palavras-chave:** *Azadirachta indica*, controle biológico, lagarta-do-cartucho do milho.

## ABSTRACT

### Action of isolated bacteria of nim on adults of *Spodoptera frugiperda*

The objective of this work was to evaluate the fecundity and fertility of adults of *Spodoptera frugiperda* after ingesting in the larval phase bacteria isolated from the neem plant, *Azadirachta indica*. Eleven bacterial isolates were evaluated with the suspensions calibrated at the concentration of  $5.0 \times 10^8$  cells / mL. The calibration was done in a spectrophotometer adjusted to 540 nm of optical density. Suspensions were used to treat fragments of corn leaves that were offered as feed for newly hatched caterpillars of *S. frugiperda*. Control caterpillars received untreated corn leaves. With the surviving adults of these caterpillars were formed couples who were kept in cages. The longevity of males and females, pre-oviposition period and fertility, number of days of oviposition and total postures, fertility and fertility of females were evaluated. Of the total number of isolates evaluated, 64.0% of them had an adverse effect on adults, to the point of affecting one or more of the evaluated variables. Intake of bacteria by caterpillars reduced adult, male and female longevity. The females had a reduction in the fertile period, number of postures, fecundity and fertility. Only the pre-oviposition period was not affected. The isolates Bacillus sp. Epi 9, Bacillus subtilis and Nim 10 were highlighted, therefore, they affected the largest number of variables evaluated. The results obtained in this work are promising and important, because this is the first report of bacteria isolated from neem with pathogenic action to adults of *S. frugiperda*.

**Keywords:** *Azadirachta indica*, biological control, fall armyworm.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma praga polífaga que ataca diversas culturas de importância econômica como milho, arroz, cana-de-açúcar, sorgo, dentre outras (CASMUZ et al., 2010; EFSA, 2017). Além disso, esses seus hospedeiros são cultivados em áreas muito próximas em diferentes épocas do ano, o que torna o seu controle difícil, devido ao deslocamento desta praga entre as áreas cultivadas (SILVA et al., 2017).

Nos primeiros instares larvais, *S. frugiperda* encontra-se esse inseto raspando a epiderme da parte inferior das folhas de seus hospedeiros. Em plantas de milho com até 30 dias após a germinação, as lagartas de instares mais avançados podem cortá-las na base do colmo de forma semelhante àquela realizada por *Agrotis ipsolon* (Hufnagel) (EFSA, 2017). *Spodoptera frugiperda* pode ainda danificar as inflorescências e as espigas de milho. Esse inseto é considerado praga chave do milho e pode reduzir a produção de 34,0% a 52,0% (VALICENTE, 2015).

Em milho, devido aos prejuízos causados pelas lagartas utiliza-se como principal método o controle químico, apesar dos casos de resistência desse inseto aos produtos utilizados (CRUZ et al. 2002). Além disso, os inseticidas também são nocivos ao ambiente, ao homem e aos inimigos naturais das pragas. Esses problemas têm incentivado os pesquisadores a buscarem métodos de controle alternativos, para *S. frugiperda* e para outras pragas também, produtos que sejam eficientes e ambientalmente seguros. Os microrganismos como vírus, fungos e bactérias têm sido muito utilizados como agentes de controle de diversos insetos-praga e, podem ser uma alternativa promissora para o manejo de *S. frugiperda*. Promissor também tem sido o uso de inseticidas botânicos para o controle de *S. frugiperda*. Como exemplo do sucesso dos inseticidas botânico como método de controle de pragas tem-se a espécie vegetal *Azadirachta indica*, nim, que tem se mostrado tóxica a um grande número de insetos, inclusive a *S. frugiperda* (LIMA et al., 2008).

A *A. indica* causa diversos efeitos nocivos aos insetos, como ação antialimentar, de repelência, de interferência nas funções biológicas, fisiológicas e químicas, de redução do crescimento, de inibição do processo de troca de exoesqueleto e na reprodução, além de causar a morte da praga (ROEL, 2010; COSTA et al., 2004). Nesta planta já foram identificados diversos metabólitos secundários biologicamente ativos aos insetos. Foram identificados alcaloides, flavonoides, triterpenoides, compostos

fenólicos, carotenoides, esteroides, cetonas e óleos voláteis (EL-HAWARY et al., 2013; BEVILACQUA et al., 2008; VERMA et al., 2011). Dentre esses compostos destaca-se a azadiractina, que é o principal componente inseticida da planta nim (EL-HAWARY et al., 2013). A azadiractina, quando ingerida pelo inseto, age na epiderme, no processo de troca de exoesqueleto, o que afeta o crescimento e desenvolvimento da praga, isto porque é bioidentica ao hormônio da ecdise (ANURADHA et al., 2007).

Em *A. indica*, além dos compostos secundários já identificados, também foram isolados, caracterizados e identificados fungos e bactérias associados a esta planta (VERMA et al., 2007; VERMA et al., 2009; VERMA et al., 2011; CARDOSO, 2012; KUSARI et al., 2012; SINGH et al.; 2017; D'LUIS et al. 2017). Verma et al. (2007) sugeriram que os microrganismos endofíticos presentes nas plantas produzem uma ou mais das substâncias químicas encontradas nas espécies vegetais. Kusari et al. (2012) constataram que o fungo endofítico, *Eupenicillium parvum*, isolado da planta nim produziu substâncias identificadas como azadiractina A e B quando multiplicado em meio artificial. O fungo *Nigrospora* sp., também endofítico de nim foi capaz de produzir solanapyrones N, O e C, substâncias análogas aquelas encontradas em *A. indica* (WU et al., 2009).

O conhecimento de que, microrganismos associados a uma espécie vegetal foram capazes de sintetizar substâncias similares aquelas produzidas pelo seu hospedeiro, amplia a necessidade de novos estudos sobre a interferência destes organismos na ação inseticida que é observada em algumas espécies vegetais. Isso abre inúmeras perspectivas biotecnológicas para esta área. Dentre os grupos de microrganismos mais citados e isolados da planta nim encontram-se os fungos (VERMA et al., 2007; VERMA et al., 2011), os actinomicetos (VERMA et al., 2009; VERMA et al., 2011) e as bactérias (D'LUIS et al., 2017).

Cardoso (2012) caracterizou 33 bactérias isoladas de *A. indica* quanto a morfologia das células e colônias, a coloração de Gram, o potencial para a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de fosfato e a síntese de auxina. Todas elas pertenciam ao gênero *Bacillus* e foram Gram-positivas. Foram identificadas como *Bacillus pumilus* (7), *Bacillus methylotrophicus* (1), *Bacillus licheniformis* (2), *Bacillus subtilis* (2), *Bacillus amyloliquefaciens* (1) *Bacillus* sp. (19) e *Methylobacterium* sp. (1). O autor constatou que algumas das bactérias possuíam potencial para a produção de ácido indol-3-acético (AIA). Soares (2013) avaliou os 33 isolados bacterianos de nim quanto a patogenicidade e virulência a lagartas de *S. frugiperda* com 10 dias de idade. O

autor constatou que a ingestão de folhas de milho tratadas com suspensões dessas bactérias causou no inseto aumento na duração e mortalidade das fases larval e pupal, redução no peso de pupas macho e fêmea e aumento na deformação de adultos. Silva (2014) trabalhou com 13 isolados desses isolados mais virulentos a *S. frugiperda*. O autor constatou que, tanto as células bacterianas centrifugadas quanto o filtrado do meio de crescimento desses microrganismos reduziram a sobrevivência e desenvolvimento do inseto. Estes estudos demonstraram o grande potencial dessas bactérias do nim para o controle de *S. frugiperda*.

A utilização de microrganismos entomopatogênicos como agentes de controle biológico é vantajosa, pois evita o desequilíbrio ecológico nos agroecossistemas, já que eles são específicos para os insetos-alvo e seletivos aos inimigos naturais (ALVES, 1998). Esse autor explica que, além desses microrganismos causarem a morte do inseto-alvo podem afetar também as características biológicas e reprodutivas da praga. Comenta que os entomopatógenos podem ser utilizados associados a outros métodos no manejo de pragas, além de não poluírem o ambiente e não serem tóxicos aos homens e animais, desde que, selecionados e manuseados corretamente.

O emprego dos microrganismos endofíticos na agricultura tem aumentado muito nos últimos anos, pois além de trazerem benefícios às plantas, por exemplo promovendo o seu crescimento podem controlar as pragas, insetos e doenças, o que substitui o uso produtos químicos, além de preservar o ambiente (PEIXOTO NETO et al., 2002).

Os resultados obtidos por Soares (2013) e Silva (2014) comprovaram a ação patogênica das bactérias isoladas da planta nim na sobrevivência e desenvolvimento de *S. frugiperda*, além de possibilitar a seleção daquelas mais virulentas ao inseto. Esses autores comprovaram que as bactérias mais virulentas reduziram o número de adultos viáveis a serem incorporados na população. Entretanto, estes autores não avaliaram o desempenho dos adultos dos insetos sobreviventes. Neste trabalho, os adultos sobreviventes foram avaliados, pois se postula que, a ingestão de folhas tratadas com as suspensões bactérias pelas lagartas afeta negativamente a fecundidade e fertilidade dessa fase do inseto. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a fecundidade e a fertilidade de adultos de *S. frugiperda*, após as lagartas ingerirem folhas de milho tratadas com as bactérias isoladas de *A. indica*.

## 2 INTRODUÇÃO DO ARTIGO

As espécies vegetais estão associadas a uma extensa e diversa comunidade de microrganismos, dentre eles, as bactérias e os fungos (HARDOIM et al. 2015; VERMA et al., 2009). Esses microrganismos endofíticos não causam sintomas de doença em seus hospedeiros, mas vivem de forma simbiótica com eles (WILSON, 1995).

*Azadirachta indica*, nim, é uma das espécies vegetais mais estudada no mundo quanto a sua microbiota, devido a sua importância como planta medicinal, já que é utilizada por cerca de 80,0% das nações em desenvolvimento (EID et al., 2017; CHUTULO E CHALANNAVARR, 2018). Além disso, é uma planta inseticida de grande importância (VERMA et al., 2011). Todas as partes da planta nim já foram avaliadas para o seu uso no controle de insetos e todas elas se mostraram nocivas às pragas. Já foi verificado que o nim tem, sobre os insetos, efeito anti-alimentar, de repelência a oviposição e de inibição de outras atividades biológicas e fisiológicas desses organismos. Além dessas interferências, o nim pode reduzir o crescimento dos insetos, inibir a ecdise e a reprodução, além de causar a sua morte (ROEL, 2010; COSTA et al., 2004). A azadiractina, principal composto presente no nim, afeta negativamente a troca de exoesqueleto e o crescimento do inseto, pois se assemelha ao hormônio da ecdise (ANURADHA et al., 2007).

Em *A. indica*, além dos metabólitos secundários, já foram isolados, caracterizados e identificados fungos e bactérias associadas de forma simbiótica a esta planta (VERMA et al., 2007; VERMA et al., 2009; VERMA et al., 2011; CARDOSO, 2012; KUSARI et al., 2012; SINGH et al.; 2017; D' LUIS et al., 2017). Esses microrganismos endofíticos foram responsáveis pela biossíntese parcial ou completa de metabólitos secundários presentes em suas plantas hospedeiras (RAJAGOPAL et al., 2012; LUDWIG-MÜLLER, 2015). Exemplo desse fato foi constatado com o fungo endofítico, *Eupenicillium parvum*, que foi isolado da planta nim. Segundo os autores, no filtrado de seu meio artificial de crescimento foram identificadas as substâncias azadiractina A e B (KUSARI et al., 2012). O fungo *Nigrospora* sp., também endofítico do nim, produziu em seu meio de crescimento solanapyrones N, O e C, substâncias análogas aquelas produzidas na planta (WU et al., 2009).

Dentre os grupos de microrganismos mais citados na literatura e que já foram isolados da planta nim encontram-se os fungos (VERMA et al., 2007; VERMA et al.,

2011), os actinomicetos (VERMA et al., 2009; VERMA et al., 2011) e as bactérias (D'LUIS et al., 2017).

Cardoso (2012) caracterizou 33 bactérias associadas a planta nim, dentre elas foram identificados *Bacillus pumilus* (7), *Bacillus methylotrophicus* (1), *Bacillus licheniformis* (2), *Bacillus subtilis* (2) e *Bacillus amyloliquefaciens* (1), *Bacillus* sp. (19) *Methylobacterium* sp. (1). Este autor constatou que alguns desses isolados possuem potencial para a produção de ácido indol-3-acético (AIA). Soares (2013) avaliou esses isolados quanto a patogenicidade e virulência as lagartas de *S. frugiperda*. O autor verificou que, a ingestão de folhas de milho tratadas com as suspensões bacterianas causou aumento na duração e mortalidade das fases larval e pupal, redução no peso de pupas macho e fêmea e aumento na deformação de adultos o que reduziu o número de adultos viáveis na população. Silva (2014) constatou que, tanto as células bacterianas quanto o filtrado do seu meio de crescimento afetaram negativamente o crescimento e desenvolvimento de *S. frugiperda* e reduziram a sobrevivência do inseto.

Os estudos realizados por Soares (2013) e Silva (2014) indicaram o grande potencial de controle que possui as bactérias isoladas de *A. indica* para o manejo de *S. frugiperda*, pois demonstrar que essas bactérias reduziram o número de adultos viáveis a serem incorporados na população. Entretanto, torna-se importante conhecer qual é o desempenho desses adultos sobreviventes. Neste trabalho esses adultos foram avaliados, pois postula-se que, a ingestão de folhas de milho tratadas com as suspensões bacterianas pelas lagartas afeta negativamente a fecundidade e fertilidade de *S. frugiperda*. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a fecundidade e a fertilidade de adultos de *S. frugiperda* após ingestão pelas lagartas de folhas de milho tratadas com as suspensões bacterianas de *A. indica*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos Laboratórios de Patologia de Insetos e de Fitopatologia da Universidade Estadual de Montes Claros, UNIMONTES, *Campus* de Janaúba, MG.

As lagartas de *Spodoptera frugiperda* utilizadas nos ensaios foram provenientes da criação-estoque mantida no laboratório de Entomologia, sob condições controladas (temp.: 25±2°C, U.R.: 60±10 % e fotofase: 12 h) e alimentadas com dieta artificial (GREENE et al., 1976). Os adultos foram alimentados com solução de mel a 10,0%.

Os isolados bacterianos avaliados foram: Epi 1 (*Bacillus* sp.), Epi 7 (*Bacillus pumilus* - E value de 0,0, identidade de 99,0% e número de acesso ao Genbank - KR010188.1), Epi 9 (*Bacillus* sp. - E value de  $3.e^{-50}$ , identidade de 95,0%, número de acesso ao Genbank - KM678261.1), Epi 12 (*Bacillus* sp.), Epi 13 (*Bacillus* sp. - E value de  $3.e^{-55}$ , identidade de 97,0%, número de acesso ao Genbank - JN700129.1), Nim 5 (*Bacillus methylotrophicus* - E value de 0,0, identidade de 99,0%, número de acesso ao Genbank - KM659219.1), Nim 8 (*Bacillus subtilis* - E value de 0,0, identidade de 98,0%, número de acesso ao Genbank - KF818630.1), Nim 10 (*Bacillus* sp.), Nim 12 (*Bacillus* sp.), Nim 14 (*Bacillus* sp.) e Nim 15 (*Bacillus pumilus* - E value de 0,0, identidade de 99,0%, número de acesso ao Genbank - KR010188.1). Estes isolados foram obtidos junto à Bacterioteca do Laboratório de Fitopatologia da UNIMONTES, Campus de Janaúba, MG, onde estão armazenados em água mineral esterilizada e mantidos em condições controladas (temp.:  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , U.R.:  $60\pm 10\%$  e fotofase: 14 h). Essas bactérias foram isoladas da superfície (epifítica - Epi) e do extrato fermentado (Nim) de folhas de *Azadirachta indica* (CARDOSO, 2012).

### **3.1 Cultivo das plantas de milho**

Sementes de milho crioulo foram semeadas em vasos plásticos ( $3,0\text{ dm}^3$ ). As plantas foram mantidas sob condições de telado, localizado na área experimental da UNIMONTES. Durante o período de cultivo as plantas não receberam nenhum tratamento fitossanitário para o controle de pragas.

Folhas da região do cartucho de plantas com 15 dias após a germinação foram utilizadas na alimentação de lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda*, visando à realização do ensaio com os insetos adultos da praga.

### **3.2 Multiplicação dos isolados bacterianos**

Para a multiplicação dos isolados bacterianos, o meio de cultura sólido TSA (Tryptic Soy Agar) (40 g) foi pesado, colocado em Erlenmeyer e sobre ele adicionada água destilada até completar o volume de 1.000 mL. O meio foi esterilizado em autoclave, regulada para  $120^{\circ}\text{C}/1,0\text{ atm}$ , durante 20 minutos. Após a esterilização, o meio foi vertido em placas de Petri (90 mm x 15 mm), em câmara de fluxo laminar. A multiplicação das bactérias foi realizada a partir da transferência de uma alíquota (1,0

mL) de uma suspensão de armazenamento para as placas contendo o meio TSA. Os isolados foram incubados em temperatura ambiente por 24 horas.

Sobre as colônias bacterianas incubadas nas placas de Petri foi adicionado 5,0 mL de solução salina (NaCl a 0,85%) estéril. As células bacterianas foram desagregadas, usando uma lâmina de vidro de microscópio esterilizada e, então, transferidas para tubos de ensaio (2,5 cm x 15 cm), para homogeneização em aparelho Vortex. Em espectrofotômetro ajustado para 540 nm de densidade óptica, a absorbância das suspensões bacterianas de cada um dos isolados foi ajustada, de modo que, a concentração atingisse  $5,0 \times 10^8$  células/mL. Os ajustes das absorbâncias foram embasados nas curvas de crescimento destes isolados bacterianos estabelecidas por Silva (2014). Para o ajuste da concentração das suspensões bacterianas foi adicionado NaCl (0,85 %) estéril.

### **3.3 Obtenção de pupas de *Spodoptera frugiperda***

Folhas retiradas da região central do cartucho de plantas de milho foram levadas ao laboratório e cortadas em fragmentos (5,0 cm x 5,0 cm). Em câmara de fluxo laminar os fragmentos foram imersos, durante 20 segundos, nas suspensões bacterianas ajustadas para a concentração de  $5,0 \times 10^8$  células/mL. Como controle do experimento, os fragmentos foram imersos em água destilada esterilizada. Os fragmentos tratados e não tratados foram dispostos sobre papel filtro, para ocorrer à perda do excesso de umidade.

Cinco fragmentos de folhas de milho foram inseridos, verticalmente, em uma fina camada de meio ágar-ágar esterilizado que foi previamente vertida no fundo de recipientes plásticos transparentes (250 mL). O ágar-ágar foi utilizado para evitar que as folhas de milho enrolassem e, também, para manter a turgidez das mesmas. Para cada tratamento (isolados e controle) foram preparados três desses recipientes. Em cada um dos recipientes, sobre as folhas de milho foram transferidas, aproximadamente, 200 lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda* retiradas da criação estoque e, então, os fracos foram fechados. As lagartas se alimentaram das folhas tratadas durante três dias, quando então, se realizou a substituição destas por outras não tratadas. As lagartas permaneceram se alimentando das folhas não tratadas por mais cinco dias, quando então foram individualizadas em tubos de vidro com fundo chato (2,5 cm x 8,5 cm), também contendo uma fina camada ágar-água em seu fundo e um fragmento de folha de milho

inserido, conforme descrito anteriormente. Nos tubos, as lagartas foram alimentadas até a pupação. A troca de alimento nesta etapa do experimento foi realizada sempre que necessário. As lagartas do controle foram criadas em milho não tratado, durante todo o período larval.

As pupas obtidas foram retiradas dos tubos, limpas e sexadas, conforme descrito por Butt (1962). Após a sexagem das pupas, os machos e as fêmeas foram individualizados em novos tubos de vidro, onde permaneceram até a emergência.

### **3.4 Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda***

Os adultos emergidos, machos e fêmeas, com até dois dias de idade e sem deformações foram utilizados na formação dos casais de *S. frugiperda*. Cada casal formado foi transferido para uma gaiola constituída por um tubo de PVC (7,0 cm de diâmetro x 10 cm de altura), que teve sua parede interna revestida por papel sulfite, que serviu de substrato de postura. A extremidade inferior da gaiola foi fechada com uma placa de Petri (80 mm x 80 mm) e a superior com um tecido fino do tipo *Voil*. Os adultos foram alimentados nas gaiolas com uma solução de mel a 10,0%, que foi trocada a cada dois dias. Os insetos foram mantidos nestas condições até a morte.

Diariamente, enquanto durou o período de oviposição das fêmeas, as posturas de *S. frugiperda* foram retiradas das gaiolas, contabilizadas e colocadas em placas de acrílico transparente (50 mm x 50 mm) forradas com papel-filtro umedecido com água destilada, visando a eclosão. As placas foram mantidas em laboratório sob condições controladas (temp.: 25±2°C, U.R.: 60±10 % e fotofase: 12 h).

Foram avaliadas a longevidade de macho e fêmea, o período de pré-oviposição e fértil das fêmeas, o número de dias de oviposição, o número total de posturas, o número total de ovos por fêmea (fecundidade) e a viabilidade dos ovos (fertilidade). A longevidade de macho e fêmea correspondeu ao tempo transcorrido entre a emergência até a morte do inseto. O período fértil das fêmeas correspondeu ao tempo transcorrido entre o primeiro e o último dia de oviposição. O número de dias de oviposição correspondeu ao número de dias em que a fêmea fez posturas. O período de pré-oviposição correspondeu ao tempo transcorrido entre a emergência da fêmea até o dia em que ela iniciou a oviposição.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e constituído por onze tratamentos (folhas de milho tratadas com os isolados bacterianos) e um controle (folhas

de milho não tratadas). Cada tratamento constou de 15 repetições (gaiolas), contendo cada uma um casal de *S. frugiperda*.

Foram realizados testes de homogeneidade das variâncias e normalidade dos erros e, como as variáveis avaliadas não se ajustaram a estas exigências, os resultados foram submetidos à análise Kruskal-Wallis e as médias comparadas pelo teste de Bonferroni, a 5% de probabilidade. O Programa estatístico utilizado em todas as análises foi o Statisticx versão 9.0.

## 4 RESULTADOS

A ingestão, pelas lagartas de *S. frugiperda*, de folhas de milho imersas nas suspensões de bactérias isoladas da planta nim, *A. indica*, afetou todas as variáveis avaliadas, exceto o período de pré-oviposição das fêmeas deste inseto (Tabela 1).

Para a longevidade, foi observada redução no tempo de vida das fêmeas após as lagartas de *S. frugiperda* ingerirem folhas contendo os isolados Epi 9 e Nim 8, o que as fez viverem 5,0 dias a menos do que as do controle ( $X^2 = 88,1989$ ;  $P < 0,00001$ ) (Tabela 1). As lagartas que ingeriram os demais isolados resultaram em fêmeas tão longevas quanto as do controle. Os machos também tiveram sua longevidade reduzida ( $X^2 = 68,2614$ ;  $P < 0,00001$ ). Essa redução ocorreu após as lagartas ingerirem os isolados Epi 7, Epi 9, Epi 13, Nim 8 e Nim 12, o que os fez viverem em torno de 3,0 dias a menos do que os do controle. Para os demais tratamentos, os machos foram tão longevos quanto os do controle.

O período de pré-oviposição das fêmeas de *S. frugiperda* não foi alterado pela ingestão dos isolados bacterianos pelas lagartas, que foram semelhantes ao controle ( $X^2 = 13,9380$ ;  $P = 0,2364$ ) (Tabela 1). Entretanto, o período fértil das fêmeas foi reduzido pela ingestão de bactérias pelas lagartas ( $X^2 = 38,3200$ ;  $P < 0,0001$ ). Este fato ocorreu quando as lagartas ingeriram os isolados Epi 9, Epi 12, Nim 8 e Nim 10. Ocorreu uma redução de até 4,0 dias para o tratamento Epi 9. Nos demais tratamentos o período fértil das fêmeas foi semelhante ao observado para o controle.

O número de dias em que as fêmeas de *S. frugiperda* realizaram suas posturas foi reduzido após a ingestão dos isolados Epi 9 e Nim 10 ( $X^2 = 36,5766$ ;  $P < 0,0001$ ) (Tabela 1). Para as fêmeas destes tratamentos o número máximo de dias em que elas realizaram suas posturas foi de até 2,0 dias. As fêmeas dos demais tratamentos distribuíram os seus ovos em maior número de dias, que foi semelhante ao controle.

O número de posturas realizadas pelas fêmeas foi reduzido após a ingestão pelas lagartas dos isolados Epi 9 e Nim 10 ( $X^2 = 27,0767$ ;  $P < 0,0045$ ) (Tabela 1). As fêmeas desses tratamentos realizaram no máximo até 3,1 posturas. Nos demais tratamentos, o número de posturas por fêmeas foi semelhante ao controle.

A fecundidade das fêmeas foi reduzida após as lagartas ingerirem os isolados Epi 9, Nim 8, Nim 10 e Nim 12 ( $X^2 = 40,6837$ ;  $P < 0,00001$ ) (Tabela 1). O número de ovos colocados por essas fêmeas variou de 230 a 370. Nos demais tratamentos as fêmeas colocaram em média número de ovos semelhante ao controle.

A fertilidade de *S. frugiperda* foi reduzida após as lagartas ingerirem isolados Epi 9 e Nim 12 ( $X^2= 87,8114$ ;  $P < 0,00001$ ) (Tabela 1). A viabilidade dos ovos destas fêmeas variou de 32,6% a 46,6%. Para as demais fêmeas avaliadas a viabilidade dos ovos foi semelhante ao controle.

**Tabela 1.** Longevidade de macho e fêmea (dias), períodos de pré-oviposição e fértil das fêmeas (dias), número de dias de oviposição, número de posturas, fecundidade (número) e fertilidade (%) de *Spodoptera frugiperda*, provenientes de lagartas alimentadas com folhas de milho tratadas com suspensão de bactérias isoladas de *Azadirachta indica*.

Isolados***	Longevidade*		Período*		Nº dias Oviposição*	Nº de posturas*	Fecundidade*	Fertilidade*
	Fêmea	Macho	Pré - oviposição	Fértil				
Controle	13,8 ± 0,5** bc	12,3 ± 0,4 bc	4,0 ± 0,3 a	6,3 ± 0,3 c	4,5 ± 0,2 c	7,1 ± 0,4 b	884,8 ± 76,3 c	96,9 ± 2,2 bc
Epi 1	16,3 ± 0,6 c	12,3 ± 0,8 bc	3,5 ± 0,3 a	5,5 ± 0,7 bc	3,7 ± 0,5 abc	6,3 ± 1,0 ab	750,6 ± 118,3 bc	100,0 ± 0,0 c
Epi 7	11,9 ± 1,3 ab	9,3 ± 0,7 a	3,8 ± 0,4 a	4,5 ± 0,8 abc	3,4 ± 0,3 abc	4,7 ± 0,5 ab	434,0 ± 52,6 abc	62,4 ± 9,4 ab
Epi 9	8,5 ± 0,5 a	9,5 ± 0,7 a	4,7 ± 0,9 a	1,8 ± 0,5 a	1,5 ± 0,4 a	2,7 ± 0,8 a	230,7 ± 78,2 a	46,6 ± 15,7 a
Epi 12	15,3 ± 0,8 bc	12,9 ± 0,7 c	5,4 ± 0,6 a	3,1 ± 0,6 ab	2,6 ± 0,4 abc	4,0 ± 0,8 ab	413,9 ± 77,7 abc	84,6 ± 10,4 bc
Epi 13	11,7 ± 0,5 ab	9,3 ± 0,5 a	3,6 ± 0,2 a	4,0 ± 0,6 abc	3,2 ± 0,5 abc	4,3 ± 0,7 ab	536,1 ± 98,3 abc	100,0 ± 0,0 c
Nim 5	13,6 ± 0,5 bc	10,3 ± 0,4 abc	3,5 ± 0,2 a	4,8 ± 0,6 abc	3,9 ± 0,5 bc	5,3 ± 0,7 ab	659,9 ± 114,6 abc	96,6 ± 1,7 bc
Nim 8	8,5 ± 0,5 a	9,3 ± 0,5 a	3,6 ± 0,2 a	3,2 ± 0,5 ab	2,7 ± 0,4 abc	5,1 ± 0,8 ab	370,7 ± 60,3 ab	60,7 ± 11,2 ab
Nim 10	12,5 ± 0,8 abc	12,5 ± 0,5 c	4,4 ± 0,6 a	2,9 ± 0,8 ab	1,9 ± 0,5 ab	3,1 ± 0,9 a	307,6 ± 91,4 ab	100,0 ± 0,0 c
Nim12	11,3 ± 0,8 ab	9,5 ± 0,6 a	5,9 ± 0,9 a	3,9 ± 0,9 abc	2,5 ± 0,3 abc	4,3 ± 0,8 ab	308,2 ± 58,2 ab	32,6 ± 11,3 a
Nim 14	13,7 ± 0,8 bc	10,5 ± 0,5 abc	4,0 ± 0,2 a	4,8 ± 0,7 abc	3,9 ± 0,6 bc	5,3 ± 0,9 ab	746,9 ± 133,6 abc	97,7 ± 1,2 bc
Nim 15	16,9 ± 0,7 c	13,1 ± 0,5 c	4,1 ± 0,3 a	3,7 ± 0,8 abc	2,6 ± 0,6 abc	4,0 ± 0,8 ab	472,6 ± 113,0 abc	100,0 ± 0,0 c
X <sup>2</sup>	88,20	68,26	13,94	38,32	36,58	27,08	40,68	87,81

\* Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

\*\*  $X \pm S(X)$ .

\*\*\* Epi 1 (*Bacillus* sp.), Epi 7 (*Bacillus pumilus*), Epi 9 (*Bacillus* sp.), Epi 12 (*Bacillus* sp.), Epi 13 (*Bacillus* sp.), Nim 5 (*Bacillus methylotrophicus*), Nim 8 (*Bacillus subtilis*), Nim 10 (*Bacillus* sp.), Nim 12 (*Bacillus* sp.), Nim 14 (*Bacillus* sp.) e Nim 15 (*Bacillus pumilus*).

## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, 64,0% das bactérias isoladas de *Azadirachta indica* provocaram algum efeito nocivo aos adultos de *Spodoptera frugiperda*, a ponto de afetarem uma ou mais das variáveis avaliadas. Essa porcentagem de isolados bacterianos patogênicos apresentaram virulência variável aos adultos de *S. frugiperda* sobreviventes das lagartas que ingeriram folhas de milho tratadas com os microrganismos. Foram entomopatogênicos aos adultos os isolados Epi 7 (*Bacillus pumilus*), Epi 9 (*Bacillus* sp.), Epi 12 (*Bacillus* sp.), Epi 13 (*Bacillus* sp.), Nim 8 (*Bacillus subtilis*), Nim 10 (*Bacillus* sp.) e Nim 12 (*Bacillus* sp.). Os isolados Epi 1, Nim 5, Nim 14 e Nim 15 não afetaram negativamente os insetos adultos, pois não foram constatadas alterações nas variáveis avaliadas.

Do ponto de vista da patologia de insetos, as bactérias entomopatogênicas podem ser agrupadas em esporulantes e não-esporulantes. As esporulantes incluem todas aquelas que são obrigatórias e a maioria das facultativas (cristalíferas e não cristalíferas). As não esporulantes incluem aquelas que são potenciais e apenas uma espécie que é totalmente facultativa (FALCON, 1971). As bactérias esporulantes produzem endóporos, que é uma estrutura de persistência (resistência) que as permite sobreviverem em ambientes adversos (POLANCZYK et al., 2011). Esses mesmo autores complementaram explicando que, essa característica, juntamente com uma alta virulência, elevada capacidade invasora e produção de toxinas se constituem em pré-requisitos para a produção de agentes microbianos em escala comercial. Essas são características que se destacam nas espécies dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*. As espécies do gênero *Bacillus*, Gram-positivos, possuem diversos mecanismos de ação sobre insetos-praga e as doenças de plantas. As que são entomopatogênicas, causam doenças em diversas Ordens de insetos, por esse motivo, são muito utilizadas no controle biológico de insetos-praga (LANNA FILHO et al. 2010; RAJASHEKHAR et al., 2017).

Dentre os isolados bacterianos avaliados neste trabalho, já foram identificados *B. pumilus* (2), *B. methylophilus* (1) e *B. subtilis* (1) (Tabela 1). O *B. pumilus*, Epi 7, foi patogênico aos machos de *S. frugiperda*, pois causou redução na longevidade. O *B. subtilis*, Nim 8, afetou as fêmeas e os macho de *S. frugiperda*, pois reduziu a longevidade desses insetos, além do período fértil e fecundidade das mesmas. O *B. methylophilus* não afetou o inseto adulto.

Neste trabalho o *B. subtilis* e o *B. pumilus* foram isolados da planta nim, entretanto, estas espécies já foram encontradas em outros habitats. *Bacillus subtilis*, por exemplo, já foi isolado de solo, da rizosfera, do rizoplano, do filoplano e de tecidos internos de plantas

(ONGENA et al., 2005; CAMPOS SILVA et al., 2008). Isolados de *B. subtilis* possuem múltiplos mecanismos antagonísticos aos fitopatógenos, como inibição da germinação de esporos, paralisação do crescimento do tubo germinativo e interferência na fixação do patógeno na planta (LANNA FILHO et al., 2010). Por esse motivo, este microrganismo é utilizado no controle de fitopatógenos de várias espécies de plantas cultivadas e é uma alternativa eficiente para o manejo integrado de doenças (D'AGOSTINO; MORANDI, 2009). O *B. pumilus* é uma bactéria com ampla gama de atividade que são importantes do ponto de vista biotecnológico. Já foi relatada possuir atividade antibacteriana e promotora de crescimento de plantas (JOO et al., 2005; AUNPAD et al. 2007).

Poucas são as informações sobre o uso de *B. subtilis* e *B. pumilus* no controle de insetos-praga. Santos (2012) constataram que produtos à base de *B. subtilis* e *B. pumilus* foram patogênicos as lagartas recém-eclodidas de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). Molina et al (2010) avaliaram 115 isolados bacterianos e identificaram um deles como sendo *B. pumilus* e possuidor de alta patogenicidade as larvas de primeiro ínstar de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Garcia-Ramon et al. (2016) caracterizaram morfológicamente e bioquimicamente o isolado 15.1 de *B. pumilus*, que é entomopatogênico a *C. capitata* e, observaram em ultramicroscopia a presença de estruturas geométricas semelhantes as inclusões de cristal paraesporal semelhante ao *B. thuringiensis*. Rishad et al. (2017) isolaram, caracterizaram e avaliaram o potencial de controle de isolados bacterianos produtores de quitinases. Os autores constataram que, a enzima bruta obtida do isolado MCB-7 de *B. pumilus* quando purificada apresentou atividade antifúngica (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Ceratorhiza hydrophila* e *Fusarium oxysporum*), além de ser inseticida as larvas de *Scirpophaga incertulas* (Walker). (Lepidoptera: Pyralidae).

Dentre os sete isolados bacterianos que foram patogênicos aos adultos de *S. frugiperda*, a bactéria *Bacillus* sp. Epi 9 destacou-se como a mais virulenta, pois afetou negativamente um maior número de variáveis avaliadas (Tabela 1). Esse isolado reduziu a longevidade de fêmeas e machos, o período fértil, o número de dias oviposição, o número de posturas, a fertilidade e a fecundidade das fêmeas. Essa bactéria reduziu nas fêmeas 38,0% o tempo de vida, 71,0% do período fértil, 66,5% do período de oviposição, 62,5% do número de posturas, 74,0% da fecundidade e 51,0% da fertilidade.

Vários podem ter sido os motivos para que o isolado *Bacillus* sp. Epi 9 tenha sido o mais virulento aos adultos de *S. frugiperda*, em relação aos demais entomopatógenos avaliados. Um dos motivos pode estar relacionado à presença de um cristal proteico no

interior da célula bacteriana, a semelhança do observado para o *B. thuringiensis*, que possui as proteínas Cry e/ou Cyt (VILAS-BÔAS et al., 2012). Se este for o caso, na célula da bactéria *Bacillus* sp. Epi 9, as proteínas Cry e Cyt seriam sintetizadas na forma de protoxinas e somente ativadas quando estivessem no interior do aparelho digestório das lagartas, que é básico (ANGELO et al., 2010). O dano que essa toxina causaria no sistema digestório das lagartas de *S. frugiperda* poderia ser a morte ou o suficiente para afetar a absorção de nutrientes. Nas lagartas que sobreviveram a ingestão das bactérias, provavelmente, a toxina afetou a absorção de nutrientes o que pode ter levado ao inseto adulto a uma desnutrição. Chapman (2013) explica que, a falta de nutrientes ou mesmo a menor quantidade de alimento assimilada na fase larval pode afetar a maturação dos ovários nas fêmeas e, com isso, ocorre a uma menor formação de ovariolos nos ovários que compromete a fecundidade e fertilidade do inseto. Entretanto, o isolado *Bacillus* sp. Epi 9 pode ter outro modo de ação sobre o inseto hospedeiro que não os cristais. O desconhecimento do modo de ação desse microrganismo promissor, indica a necessidade de novos estudos sobre a relação patógeno-praga.

Assim, independentemente do modo de ação utilizado pelo isolado *Bacillus* sp. Epi 9, este se mostrou promissor para que futuramente seja utilizado em programas de manejo integrado de *S. frugiperda*. Torna-se importante a identificação de novos microrganismos para serem utilizados no controle biológico de insetos pragas, já que em sua maioria os produtos comercializados são a base de *B. thuringiensis* que é uma tecnologia importada. Esse fato encarece o produto final, que é repassado para o consumidor. O preço elevado desse produto diminui a competitividade que um produto biológico possa ter em relação aos inseticidas sintéticos (ANGELO et al., 2010). Outro fato importante quanto ao uso dos produtos a base de *B. thuringiensis* é que já existem vários casos de espécies de insetos que desenvolveram resistência as toxinas produzidas por essa bactéria. Por esse motivo, pesquisas com outras espécies de bactérias devem ser realizadas (BERGAMASCO et al., 2013; RAJASHEKHAR et al., 2017). Os resultados promissores obtidos com o isolado Epi 9 abre precedentes para novas pesquisas, que visem o estudo do modo de ação desse microrganismo e comprovação de sua eficiência em campo.

## REFERÊNCIAS

- ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.
- ALVES, S. B.; MOINO JÚNIOR, A.; ALMEIDA, J. E. M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 217-238, 1998.
- ANURADHA, A.; ANNADURAI, R. S.; SHASHIDHARA, L. S. Actinocyto skeleton as a putative target of the neem limonoid azadirachtin A. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 6, p. 627-634, 2007.
- AUNPAD, R.; NA-BANGCHANG, K. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. **Current microbiology**. V. 55, p. 308-313. 2007.
- BERGAMASCO, V. B. et al. *Bacillus thuringiensis* CryIIa10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). **Journal of invertebrate pathology**, v. 112, n. 2, p. 152-158, 2013.
- 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.
- BUTT, B. Sex determination of lepidopterous pupae. **USDA, Agricultural Research Service Report**, v. 33, n. 75, p. 1-7, 1962.
- CAMPOS SILVA, J. R. et al. Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1062-1072, 2008.
- CARDOSO, A. M. S. Caracterização fisiológica de isolados bacterianos obtidos de *Azadirachta indica* e de bananeira 'Prata-anã'. **Monografia (Graduação em Agronomia)** – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 56 p., 2012.
- CASMUZ, A. et al. Revision de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista de la Sociedad Entomologica Argentina**, v. 69, n.3-4, p. 209-231. 2010.
- CHAPMAN, R. F. **The insects: Structure and function**. 5th edition. Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 929, 2013.
- CHUTULO, E. C.; CHALANNAVAR, R. K. Endophytic mycoflora and their bioactive compounds from *Azadirachta Indica*: A comprehensive review. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 42, p. 1-12, 2018.

COSTA, E.L.N.; SILVA, R.F.P. da; FIUZA, L.M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. **Acta Biologica Leopoldensia**, v. 26, n. 2, p. 173-185, 2004.

CRUZ, I. Manejo da resistência de insetos pragas a inseticidas com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith). Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, (Embrapa Milho e Sorgo. **Documentos**, v. 2, n. 15, 2002.

D'AGOSTINO, F.; MORANDI, M. A. B. Análise da viabilidade comercial de produtos à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* para controle de fitopatógenos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 299-316, 2009.

D' LUIS, R. L.; CHAMORRO, A. L.; PÉREZ, C. A. Diversidad de bacterias endófitas aisladas de árbol de neem y su actividad inhibitoria contra el *Colletotrichum gloesporioides* causante de la antracnosis del ñame en el departamento de Sucre. **Revista Colombiana de Ciência Animal-RECIA**, v. 9, p. 48-54, 2017.

EID, A.; JARADAT, N.; ELMARZUGI, N. A Review of chemical constituents and traditional usage of Neem plant (*Azadirachta Indica*). **Palestinian Medical and Pharmaceutical Journal (PMPJ)**, v. 2, n. 2, p. 75-81, 2017.

EL-HAWARY, S. S. et al. DNA fingerprinting and botanical study of *Azadirachta indica* A. Juss. (neem) family Meliaceae. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1-13, 2013.

FALCON, L. A. Use of bacteria for microbial control. In: BURGESS, N.; HUSSEY, W. (Ed.). **Microbial control of insects and mites**. New York: Academic Press, 1971. p. 67-95.

GARCIA-RAMON, D. C.; MOLINA, C. A.; OSUNA, A.; VÍLCHEZ, S. Uma caracterização profunda da cepa entomopatogênica *Bacillus pumilus* 15.1 revela que ela produz corpos de inclusão semelhantes aos cristais paraespontais de *Bacillus thuringiensis*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 100, n. 8, p.362-369, 2016

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n. 4, p. 488-497, 1976.

HARDOIM, P. R. et al. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n.3, p. 293-320, 2015.

JOO, G. J. et al. Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of red peppers. **Journal of Microbiology (Seoul, Korea)**, v. 43, n. 6, p. 510-515, 2005.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 28, n.3, p. 1287-1294, 2012.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H.M.; PINHO, R.S.C. de. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12-20. 2010.

LIMA, J. F. M. et al. Ação de inseticidas naturais no controle de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho cultivado em agroecossistema de várzea. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 607-613, 2008.

LUDWIG-MÜLLER, J. Plants and endophytes: Equal partners in secondary metabolite production?. **Biotechnology letters**, v. 37, p. 1325-1334, 2015.

MOLINA, C. A.; CAÑA-ROCA, J. F.; OSUNA, A.; VILCHEZ, S. Selection of a *Bacillus pumilus* strain highly active against *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 5., p. 1320-1327. 2010.

ONGENA, M. et al. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 692-698, 2005.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos Endofíticos. **Biociência: Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, p. 62-76, 2002.

RAJAGOPAL, K.; MAHESWARI, S.; KATHIRAVAN, G. Diversity of endophytic fungi in some tropical medicinal plants - A report. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 12, p. 2822-2827, 2012.

RAJASHEKHAR, M. et al. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus* spp. isolated from insects. **Journal of Entomology and Zoology Studies** v. 5, n. 5, p. 581-588, 2017.

RISHAD, K. S. et al. Biocontrol potential of Halotolerant bacterial chitinase from high yielding novel *Bacillus Pumilus* MCB-7 autochthonous to mangrove ecosystem. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 137, n. 3, p. 36-41. 2017.

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**, v. 54, n. 3, p. 505-510, 2010.

SILVA, D.M. et al. de. Biology and nutrition of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different food sources. **Scientia Agricola**, v.74, n.1, p.18-31, 2017.

SILVA, H. D. Virulência de bactérias associadas a *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda*. **Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido)** - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG, 73 p., 2014.

SINGH, A. K. et al. Isolation, morphological identification and *in vitro* antibacterial activity of endophytic bacteria isolated from *Azadirachta indica* (neem) leaves. **Veterinary world**, v. 10, n. 5, p. 510-516, 2017.

SANTOS, R. S. S. dos. Ação de formulações comerciais de *Bacillus* spp. sobre lagartas de *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.14, p. 1-6, 2012.

SOARES, E. P. S. Patogenicidade de bactérias isoladas de nim à *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido)** - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG, 82 p., 2013.

VALICENTE, F. H. Manejo integrado de pragas na cultura do milho. **Circular Técnica**, n. 208, p. 1-13, 2015.

VERMA, V. C. et al. The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stem tissues of *Azadirachta indica* A. Juss. (Neem) from Varanasi (India). **Microbial Ecology**, v. 54, n. 1, p. 119-125, 2007.

VERMA, V. C. et al. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and anti-microbial activity. **Microbial Ecology**, v. 57, n. 4, p. 749-756, 2009.

VERMA, V. C. et al. Endophytic fungal flora from roots and fruits of an indian neem plant *Azadirachta indica* A. Juss., and impact of culture media on their isolation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 469-476, 2011.

VILAS-BÔAS, G. T. et al. Fatores de virulência de *Bacillus thuringiensis*: o que existe além das proteínas Cry. **EntomoBrasilis**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2012.

WILSON, D. Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, v. 73, n.2, p. 274-276, 1995.

WU, S.H. et al. Two new solanapyrone analogues from the endophytic fungus *Nigrospora* sp. YB-141 of *Azadirachta indica*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 1, p. 79-85, 2009.