

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

LORENA CONTARINI MACHADO

**MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VIVO* DE *Spodoptera frugiperda* multiple  
*nucleopolyhedrovirus* (Lefavirales: Baculoviridae)**

ALEGRE

2022

LORENA CONTARINI MACHADO

**MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VIVO* DE *Spodoptera frugiperda* multiple  
nucleopolyhedrovirus (Lefavirales: Baculoviridae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Hugo José Gonçalves dos Santos Junior

Coorientador: Dr. Hugo Bolsoni Zago

Coorientador: Dr. Fernando Hercos Valicente

ALEGRE

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

M149 Machado, Lorena Contarini, 1990-  
m Maximização da produção in vivo de *Spodoptera frugiperda*  
multiple nucleopolyhedrovirus (Lefavirales: Baculoviridae) /  
Lorena Contarini Machado. - 2022.  
97 f. : il.

Orientador: Hugo José Gonçalves dos Santos Junior.  
Coorientadores: Hugo Bolsoni Zago, Fernando Hercos  
Valicente.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do  
Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. MIP. 2. Controle Microbiano. 3. Entomopatógenos. 4.  
Baculovirus. 5. Lagarta-do-cartucho. I. Santos Junior, Hugo José  
Gonçalves dos. II. Zago, Hugo Bolsoni. III. Valicente, Fernando  
Hercos. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de  
Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 63

---

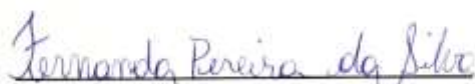
LORENA CONTARINI MACHADO

MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VIVO* DE *Spodoptera frugiperda* multiple  
nucleopolyedrovirus (Lefavirales: Baculoviridae)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Agronomia, na linha de pesquisa em Proteção Sustentável de Plantas.

Aprovada em 08 de dezembro de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**



Dr<sup>a</sup>. Fernanda Pereira da Silva

UFES



Prof. Dr. Victor Dias Pirovani

IFES - Campus de Alegre



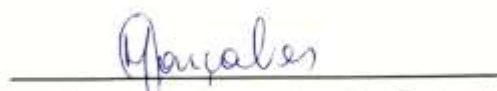
Prof. Dr. José Romário De Carvalho

SEDU/ES



Prof. Dr. Hugo Belsoni Zago

UFES



Prof. Dr. Hugo José Gonçalves dos Santos Junior

UFES

## DEDICATÓRIA

Aos meus queridos e amados pais: José Moura Machado e Cátia Maria Contarini Machado, e minha amada irmã: Luiza Contarini Machado.  
E ao meu pai na pesquisa: Prof. Hugo Gonçalves.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu amado e bondoso Deus: “Àquele que se assenta no trono e ao Cordeiro, louvor, honra, glória e poder pelos séculos dos séculos” (Ap 5,13b).

A minha amada família, obrigada, amo vocês!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES), pelo auxílio financeiro para as pesquisas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Hugo José Gonçalves dos Santos Junior, o qual considero o meu pai na pesquisa, pois ao longo desses anos foi amigo, conselheiro e formador. Foi longa nossa caminhada! Gratidão!

Aos coorientadores Prof. Dr. Hugo Bolsoni Zago e Dr. Fernando Hercos Valicente pelo apoio e orientação.

À pesquisadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Flores da Silva Ferreira pela atenção e orientação prestada.

À Laura Vaillant Ribeiro Mauri, pois muito além de amiga, Deus me concedeu uma irmã nessa caminhada. Apenas você sabe, como é importante para mim! Amiga de alma, de fé. À Amanda Gomes da Silva, irmãzinha de mestrado e afilhada, doce e agradável companhia.

A todos os amigos e funcionários do Laboratório de Entomologia, impossível citar os nomes, amo cada um de modo particular, cada partilha de café, de bons momentos de confraternização, como eu amo vocês. Família NUDEMAFI! E, em especial a equipe do Laboratório de Controle Microbiano de Insetos: Beatriz Almeida dos Santos, Nathalia Puppim de Oliveira Benachio, Carolina de Oliveira Soares, Julianne Almeida Rodrigues, Laura Vaillant Ribeiro Mauri. Ao Engenheiro Agrônomo Carlos Eduardo

Costa Paiva pelas valiosas sugestões para execução desta pesquisa e a disponibilidade e prontidão de sempre ajudar em todos os momentos. E a amiga Elziane Favoreto Alves, do Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia do CCAE.

A todas as pessoas que me ajudaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho.

Agora, pois, nessa etapa final, não posso deixar de mencionar a família GOU “Luz do Amor de Deus”, em especial: Nathalia, Werikis, Miquéias, Andressa e Isadora. Meus irmãos de fé. Deus, com seu amor de Pai, além de me forjar na pesquisa científica, também quis nesse TEMPO me forjar na fé. Serei Luz do Amor de Deus. Unir FÉ e VIDA; Eis a minha missão nessa terra. “Àquele que, pela virtude que opera em nós, pode fazer infinitamente mais do que pedimos ou entendemos”, darei glórias por toda eternidade (Efésios 3,20).

A Embrapa Milho e Sorgo pela assistência prestada para execução da pesquisa.

A Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade de realizar o curso.

Ao Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário (NUDEMAFI) pelo suporte para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	xi
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
1.2 REFERÊNCIAS.....	16
<b>2 CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO DE ESTÁGIO LARVAL DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM TEMPERATURAS SOB CONDIÇÃO PADRONIZADA</b> .....	21
2.1 INTRODUÇÃO .....	23
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
<b>2.2.1 Multiplicação massal e manutenção de <i>S. frugiperda</i></b> .....	24
<b>2.2.2 Determinação do desenvolvimento de <i>S. frugiperda</i> em temperaturas sob condição padronizada</b> .....	25
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	28
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	28
<b>3 CAPÍTULO II: CANIBALISMO NOS ÍNSTARES LARVAIS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE): TEMPERATURA E DISPONIBILIDADE DE ALIMENTO</b> .....	37
3.1 INTRODUÇÃO .....	39
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
<b>3.2.1 Multiplicação massal e manutenção de <i>S. frugiperda</i></b> .....	40
<b>3.2.2 Influência da temperatura e disponibilidade de alimento no hábito canibal de <i>S. frugiperda</i></b> .....	41
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.4 CONCLUSÃO.....	45
3.5 REFERÊNCIAS.....	46
<b>4 CAPÍTULO III: DIETA PARA A INOCULAÇÃO <i>IN VIVO</i> DE <i>Spodoptera frugiperda</i> <i>multiple nucleopolyhedrovirus</i> (SfMNPV) (LEFAVIRALES: BACULOVIRIDAE)</b> .....	53
4.1 INTRODUÇÃO .....	55
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
<b>4.2.1 Multiplicação massal e manutenção de <i>Spodoptera frugiperda</i></b> .....	56



4.2.2 Obtenção e produção de SfMNPV .....	57
4.2.3 Seleção de dieta de inoculação de SfMNPV .....	58
4.2.4 Determinação do teor de proteína bruta das lagartas alimentadas com dieta de inoculação.....	59
4.3 RESULTADO E DISCUSSÃO .....	60
4.3.1 Dieta de inoculação de SfMNPV e idade larval de <i>S. frugiperda</i> .....	60
4.3.2 Determinação do teor de proteína bruta das lagartas alimentadas com dieta de inoculação.....	64
4.4 CONCLUSÃO.....	65
4.5 REFERÊNCIAS.....	65
<b>5 CAPÍTULO IV: DIETA SIMPLIFICADA E SEM AQUECIMENTO PARA INOCULAÇÃO <i>IN VIVO</i> DE <i>Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus</i> (SfMNPV).....</b>	<b>75</b>
5.1 INTRODUÇÃO .....	77
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	79
5.2.1 Criação massal e manutenção de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	79
5.2.2 Obtenção e produção de SfMNPV .....	79
5.2.3 Determinação da temperatura e idade ideal de <i>S. frugiperda</i> para inoculação de SfMNPV em dieta fria .....	80
5.2.4 Produção em escala média de SfMNPV em lagartas de <i>S. frugiperda</i> inoculadas em proteína texturizada de soja.....	82
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
5.3.1 Determinação da temperatura e idade ideal de <i>S. frugiperda</i> para inoculação de SfMNPV em dieta fria .....	83
5.3.2 Produção em escala média de SfMNPV em lagartas de <i>S. frugiperda</i> inoculadas em proteína texturizada de soja.....	85
5.4 CONCLUSÃO.....	86
5.5 REFERÊNCIAS.....	86
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>96</b>

## RESUMO

O controle biológico de pragas é uma tática de manejo aplicada em sistemas produtivos, e estudos que viabilizem a sua produção são necessários para atender a demanda crescente por produtos biológicos. No Brasil, podemos destacar a disponibilidade no mercado de formulações com entomopatógenos, como no caso do vírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) (Lefavirales: Baculoviridae) usado para controlar a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Porém, a produção desse bioinseticida requer o sistema *in vivo*, e envolvem custos com a multiplicação e manutenção do hospedeiro em dieta artificial, bem como na etapa de inoculação viral, e ainda requer individualização do hospedeiro pelo mesmo apresentar hábito canibal. Dessa forma, os avanços no sistema de produção de bioinseticidas à base de vírus entomopatogênicos são extremamente necessárias para atender o mercado agrícola. Portanto, visando maximizar a produção *in vivo* de SfMNPV em *S. frugiperda* foi proposto: (1) determinar o número e a duração dos ínstaes larvais de *S. frugiperda*; (2) determinar a influência da temperatura e disponibilidade de alimento no comportamento canibal de *S. frugiperda*; (3) determinar e avaliar dietas artificiais usadas na etapa de inoculação viral de SfMNPV. Assim, com base nos resultados verificou-se uma variação de cinco a sete ínstaes e uma duração larval entre 11 a 17 dias. Com relação ao canibalismo, constatou-se que a quantidade de 15g de dieta é adequada para evitar esse comportamento em lagartas de 3º e 4º ínstaes em 72h, independentemente da temperatura, e que para o 5º ínstar essa quantidade é equivalente a 10g. Além disso, comprova-se que é possível inocular o vírus sem perdas de produção de poliedros virais em dieta à base de proteína de soja texturizada, e com uma dieta de composição simplificada para concluir a etapa de infecção viral. E ainda, ao avaliar uma dieta de textura fria para inoculação viral nas temperaturas de 25 e 31 °C em 4, 6 e 8 dias de desenvolvimento larval destacou-se a temperatura de 31 °C com idade de 6 dias, complementando-se a alimentação com uma dieta a base de gérmen de trigo, sem prejuízos na produção de poliedros virais.

**Palavras-chave:** MIP. Controle Microbiano. Entomopatógenos. Baculovírus. Lagarta-do-cartucho.

## ABSTRACT

The biological control of pests is a management tactic applied in production systems, and studies that enable its production are necessary to meet the growing demand for biological products. In Brazil, we can highlight the availability on the market of formulations with entomopathogens, as in the case of the *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) (Lefavirales: Baculoviridae) used to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). However, the production of this bioinsecticide requires an in vivo system and involves costs with the multiplication and maintenance of the host in an artificial diet, as well as in the viral inoculation stage. Thus, advances in the production system of bioinsecticides based on entomopathogenic viruses are extremely necessary to meet the agricultural market. Therefore, aiming to maximize the in vivo production of SfMNPV in *S. frugiperda* was proposed: 1) to determine the number and duration of larval stages of *S. frugiperda*; (2) to determine the influence of temperature and food availability on the cannibal behaviour of *S. frugiperda*; (3) determine and evaluate artificial diets used in the viral inoculation step of SfMNPV. Thus, based on the results there was a range of five to seven stages and a larval duration between 11 to 17 days. Regarding cannibalism, it was found that 15g of diet is adequate to avoid this behaviour in 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> instar larvae in 72h, regardless of temperature, and that for the 5<sup>th</sup> instar this amount is equivalent to 10g. Furthermore, it has been proven that it is possible to inoculate the virus without loss of viral polyhedra production in a diet based on textured soy protein, and with a diet of simplified composition to complete the viral infection stage. When evaluating a cold texture diet for viral inoculation at temperatures of 25 and 31°C at 4, 6 and 8 days of larval development, the temperature of 31°C at the age of 6 days stood out, complementing the feeding with a wheat germ-based diet, with no losses in the production of viral polyhedra.

**Keywords:** MIP. Microbial Control. Entomopathogens. Baculovirus. Fall armyworm.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) consiste de várias espécies de mariposas que são importantes pragas em todo o mundo, incluindo a espécie *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), praga chave da cultura do milho (KUMELA et al., 2018). É um inseto que possui a duração do ciclo de vida variável, do ovo ao adulto em torno de 20 a 60 dias, influenciado pela alimentação e condições climáticas da região na qual se encontra. O ovo possui um formato de cópula, cuja a base é achatada e o ovo se curva para cima até um ponto arredondado no ápice. O número de ovos por massa, é em média de 100 a 200, e a produção total por fêmea é de cerca de aproximadamente 1.500 ovos, sendo a duração dessa fase de dois a três dias (CAPINERA, 2020).

Ao eclodir os neonatos se alimentam da superfície foliar raspando-a e deixando uma membrana translúcida e quando maiores se alojam no cartucho do milho consumindo folhas novas e a parte apical do colmo. Geralmente passam por seis instares, com uma duração de cerca de 14 dias quando as larvas são criadas a 25 °C (MOREIRA; ARAGÃO, 2009; CAPINERA, 2020). Quando desenvolvidas as lagartas dirigem-se para o solo no qual passam por um período de pré-pupa, com duração de aproximadamente cinco dias, e após esse período transformam-se em pupa inicialmente com coloração alaranjada e posteriormente apresenta cor marrom-avermelhada e mede 14 a 18 mm de comprimento, com uma duração de cerca de oito a nove dias (CAPINERA, 2020; CZEPAK, C.; GODINHO, K. C. A.; MAGALHÃES, V.S. et al. 2022).

Essa espécie é uma praga polífaga, cosmopolita e por consequência de grande importância agrícola mundial pela capacidade de dispersão, da diversidade de culturas que é potencialmente capaz de atacar e ocasionar danos significativos (KUMELA et al., 2018; JING et al., 2020). Alguns levantamentos publicados demonstram o registro de 353 plantas, cultivadas e não cultivadas, pertencentes a 76 famílias, e tais registros são importantes para o desenvolvimento de estratégias de manejo e o entendimento do comportamento polífago (MONTEZANO, et al. 2018).

Além da cultura do milho, a *S. frugiperda* está inserida dentre as principais pragas do algodoeiro, cana-de-açúcar e soja, em regiões tropicais e subtropicais das Américas e da África, e para as quais o Brasil encontra-se entre os maiores produtores e exportadores. Atualmente o controle químico e de plantas geneticamente

modificadas são destaque para o manejo deste inseto (MONTEZANO et al., 2018; CARVALHO; ROSA; MENDES, 2022).

De acordo com o relatório de biotecnologia agrícola, publicado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2021) o Brasil é o segundo maior produtor de culturas transgênicas do mundo com 115 eventos aprovados, e durante a safra de 2020 a 2021 atingiu mais de 56 milhões de hectares da área total plantada com culturas, as taxas de adoção desse pacote tecnológico para as culturas da soja chegaram a 98%, do milho 88% e 80% para o algodão. Trata-se de um método bastante eficaz colaborando na preservação do meio ambiente e reduzindo a aplicação de inseticidas (BARCELOS; ANGELINI, 2018). Essa redução no número de aplicações é importante para o manejo de resistência à inseticidas químicos e consequentemente não comprometer a eficácia dos produtos à campo (CARVALHO; ROSA; MENDES, 2022; OMOTO, 2022).

Alguns dos principais grupos químicos como carbamatos, organofosforados, piretroides, espinosinas e inibidores de síntese de quitina, em algumas regiões produtoras tem atingido frequência baixa de resistência, principalmente após a associação com outros métodos de controle. No entanto isso não impediu o surgimento de plantas resistentes à proteína Bt (OMOTO, 2022). Portanto além de manter a estratégia da área de refúgio, que consiste basicamente em cultivar uma porcentagem de plantas susceptíveis a espécie praga, ou seja, que não possuam as proteínas inseticidas provenientes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) na área de cultivo, é importante integrar outras táticas de manejo, como o controle biológico (CARVALHO; ROSA; MENDES).

O controle biológico para a *S. frugiperda* apresenta algumas estratégias com parasitoides, predadores e com inseticidas biológicos de natureza microbiana. Dentre estes inseticidas biológicos destacam-se o uso da bactéria do gênero *Bacillus* (Bacillales: Bacillaceae) e o vírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (Lefavirales: Baculoviridae) (GOMES et al., 2018; SOSA-GÓMEZ et al., 2020; HUSSAIN et al., 2021).

O *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) são vírus de DNA de fita dupla em forma de bastonete, pertencem ao gênero Alphabaculovirus da família Baculoviridae que possuem genoma circular grande variando em tamanho entre 80 e 180 kbp, oclusos em cápsulas proteicas protetoras chamadas corpos de oclusão (OBs), que permitem que eles persistam por longos períodos fora do

hospedeiro (WILLIAMS; BERGOIN; OERS, 2017; BLISSARD; THEILMANN, 2018; HARRISON et al., 2018).

Além desses corpos de oclusão (OBs) existem outros dois fenótipos distintos formados ao longo da etapa do ciclo infeccioso: vírus derivado de oclusão (ODVs) e vírus em brotamento (BV) (BLISSARD; THEILMANN, 2018; HARRISON et al., 2018; REID et al., 2022). Ambos os fenótipos possuem o mesmo genoma, no entanto, são produzidos em diferentes locais na célula, constituídos de diferentes membranas e proteínas, e apresentam papéis distintos no ciclo de infecção (BLISSARD; THEILMANN, 2018).

Os corpos de oclusão (OBs) estão presentes na natureza, os quais são liberados após a morte do inseto contaminado, e que também é exigido na formulação final dos produtos de biocontrole para infectar as lagartas por via oral. Esses contêm os chamados vírus derivados de oclusão (ODVs), assim os OBs, ingeridos oralmente pelas lagartas, se desfazem no intestino médio alcalino e os ODVs liberados então infectam as células colunares no epitélio do intestino médio (CABALLERO et al., 2009; REID et al., 2022).

Dentro das células, os nucleocapsídeos virais se movem até o núcleo onde ocorre a replicação do DNA. Após a infecção dessas células, esses nucleocapsídeos adquirem um envelope por brotamento através da membrana plasmática para formar vírus brotados (BV), que espalham a infecção, conhecida como secundária, para os outros tecidos larvais pela hemocele de célula a célula. Posteriormente, esses nucleocapsídeos ficam retidos dentro do núcleo das células infectadas e obtêm um envelope derivado da membrana nuclear interna, formando os novos ODVs. Esses são ocluídos na principal proteína OB, neste caso do SfMNPV é a poliedrina (REID et al., 2022). Os OBs são liberados no ambiente quando o inseto se liquefaz e transmitem horizontalmente o vírus para novos indivíduos (BLISSARD; THEILMANN, 2018; REID et al., 2022).

A especificidade desse método e as vantagens com a qualidade do meio ambiente e a saúde do trabalhador tem impulsionado a demanda, e conseqüentemente vem assumindo um espaço maior no Manejo Integrado de Pragas (LACEY et al., 2015; GRZYWACZ; MOORE, 2017; HUSSAIN et al., 2021). Nos últimos anos as pesquisas foram direcionadas para investigações do sequenciamento dos isolados, seleção e caracterização dos mesmos, e permanece um desafio de

melhorias no sistema produtivo para atender à crescente demanda a um custo razoável (REID et al., 2022).

E os produtos biológicos têm despertado interesse como opção de ferramentas para o controle de insetos e ácaros e no manejo da resistência à inseticidas, tanto que o Comitê de Ação de Resistência a Inseticidas (IRAC) incluiu recentemente no esquema de classificação uma seção específica sobre o modo de ação dos produtos biológicos a base de vírus denominado disruptores virais da membrana peritrófica do intestino médio (SPARKS et al., 2020).

No Brasil, algumas empresas (Bosqueroli & Santos, VR Biotech e Simbiose Agro) realizam a produção *in vivo* de baculovírus usando insetos multiplicados em dieta artificial, embora haja muitos desafios, tais como problemas contínuos de garantia de qualidade e altos custos de mão de obra (SOSA-GÓMEZ et al., 2020; REID et al., 2022). E ainda, os métodos de produção comercial não são compartilhados, alguns protocolos gerais estão publicados e encontram-se acessíveis servindo de base para a produção viral (VALICENTE; TULHER; BARROS, 2010; VAN BEEK; DAVIS, 2016; REID et al., 2022).

A dose do bioinseticida para pulverizar em um hectare para controle efetivo da praga, em geral, é em torno de  $1 \times 10^{11}$  a  $5 \times 10^{12}$  OB/ha (MAPA, 2015; VAN BEEK; DAVIS, 2016). E, em média, uma lagarta infectada produz de  $10^9$  a  $10^{10}$  OB/lagarta, logo, são necessárias em média, de 100 a 500 lagartas infectadas para o tratamento de um hectare (REID et al., 2022). No entanto, muitos problemas de produção precisam ser estudados para melhoria da produção *in vivo*, como a qualidade do estoque viral, aumento do rendimento de poliedros virais, canibalismo e substratos de inoculação, otimização da dieta usada para a inoculação viral garantindo uma boa taxa de crescimento das larvas e produção de poliedros virais, inoculação homogênea do lote de lagartas (SUBRAMANIAN et al., 2006; ELVIRA et al., 2010; ELVIRA, WILLIAMS, CABALLERO, 2010; ALFAZAIRY et al., 2012; VALICENTE et al., 2013; ZAMORA-AVILÉS et al., 2017; RAMÍREZ-ARIAS et al., 2019; SAYED et al., 2021).

Diante disso, a produção *in vivo* em larga escala de bioinseticidas a base de SfMNPV envolvem os custos com a criação e manutenção do hospedeiro em dieta artificial, bem como na etapa de inoculação viral, em que o hospedeiro é individualizado pois apresenta hábito canibal (ANDOW et al., 2015; BENTIVENHA et al., 2016; SOKAME et al., 2020; STINGUEL et al., 2022). O processo de individualização requer mão de obra e o tempo dispensado nessa atividade reduz o

número de doses que podem ser produzidas diariamente, e otimizar o processo produtivo é crucial para minimizar custos (CHERRY et al., 1997; VALICENTE; TUELHER, 2009).

Portanto ressalta-se a importância de entender a dinâmica do canibalismo em condições laboratoriais com intuito de diminuir a perda devido ao hábito canibal e a busca de estratégias para eliminar o processo de individualização no sistema produtivo, economizando os custos com mão de obra para individualização (VALICENTE; TUELHER, 2009). Outra estratégia para otimizar os custos é o desenvolvimento de dietas artificiais mais econômicas para a etapa do ciclo de produção em que ocorre a inoculação viral sem interferir na produção de poliedros virais (ZAMORA-AVILÉS et al., 2017; ALFAZAIRY et al., 2012; SAYED et al., 2021).

O custo de produção está relacionado à eficiência da criação em massa do inseto hospedeiro e aos custos de infraestrutura, manejo e dieta artificial ou natural (SOSA-GÓMEZ et al., 2020). Nesse contexto propomos investigar os fatores do canibalismo nas condições de criação massal a nível laboratorial, bem como o número de ínstar, e a duração em dias de cada ínstar, em lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial em diferentes temperaturas visando disponibilizar informações que permitam avanços no método de produção *in vivo*. E propomos também o estudo de modificações na composição da dieta artificial padrão usada para a inoculação do SfMNPV, que possibilitem a redução dos custos, sem interferir na capacidade de produção viral. Bem como a substituição do gelificante que permita a inoculação viral durante o preparo da dieta sem haver a necessidade de resfriamento durante a manipulação. O intuito é conferir maior viabilidade econômica à produção, garantindo assim a competitividade, e atendendo a demanda crescente do mercado. E estudar estratégias que permitem maximizar a produção *in vivo* de SfMNPV.

## 1.2 REFERÊNCIAS

ALFAZAIRY, A.A.; SADEK, H.A.; GUIRGUIS, G.Z.; KARAM, H.H. An agar-free insect rearing artificial diet: A new approach for the low cost mass rearing of the egyptian cotton Leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Life Science Journal**, v.9, n.4, p. 1-8, 2012.



ANDOW, D.A.; FARIAS, J.R.; HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, D.; NASCIMENTO, A.R.B.; OMOTO, C. Dynamics of cannibalism in equal-aged cohorts of *Spodoptera frugiperda*. **Ecological Entomology**, v.40, n.3, p.229-236, 2015.

BARCELOS, P. H. S.; ANGELINI, M. R. Controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) em diferentes tecnologias bts (*Bacillus thuringiensis*) na cultura do milho. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 5, n. 1, p. 35-40, 2018.

BENTIVENHA, J. P. F.; BALDIN, E. L. L.; HUNT, T. E.; PAULA-MORAES, S. V.; BLANKENSHIP, E. E. Intraguild Competition of Three Noctuid Maize Pests. **Environmental Entomology**, p.1-10, 2016.

BLISSARD, G.W.; THEILMANN, D.A. Baculovirus Entry and Egress from Insect Cells. **Annual Review of Virology**, v.5, n.1, p.113-139, 2018. doi: 10.1146/annurev-virology-092917-043356.

CABALLERO, P.; MURILLO, R.; MUÑOZ, D.; WILLIAMS, T. El nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) como bioplaguicida: análisis de avances recientes em España. **Revista Colombiana de Entomología**, v.35, n.2, p.105-115, 2009.

CAPINERA, J.L. 2020. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). Publication #EENY098. Florida (FL): UF/IFAS Extension Service, University of Florida. Disponível em: <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/in255>. Acessado em: 20 Out. 2022.

CARVALHO, I. F. DE; ROSA, A. P. S. A. DA; MENDES, S. M. **Fatores importantes na escolha de plantas geneticamente modificadas com tecnologia Bt**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2022. 19 p. (Documentos / Embrapa Clima Temperado, 522).

CHERRY, A.J.; PARNELL, M.A.; GRZYWACZ, D. JONES, K. The optimization of *in vivo* nuclear polyhedrosis virus production in *Spodoptera exempta* (Walker) and *Spodoptera exigua* (Hübner). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.70, n.1, p.50-58, 1997.

CZEPAK, C.; GODINHO, K. C. A.; MAGALHÃES, V.S. Pragas do milho doce. In: RAGA, A. [et al.] **Manual de entomologia: v.1 pragas das culturas**. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres, 2022. p. 337- 362.

ELVIRA, S.; GORRÍA, N.; MUÑOZ, D.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. A. Simplified Low-Cost Diet for Rearing *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and Its Effect on *S. exigua* Nucleopolyhedrovirus Production. **Biological and microbial control**, v.103, n.1, p.17-24, 2010.

ELVIRA, S.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. Juvenile hormone analog technology: effects on larval cannibalism and the production of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. **Journal of economic entomology**, v.103, n.3, p. 577-582, 2010.

GOMES, J. M.; GODOY, M. S. DE; BARRETO, R. V. G.; LIRA, A. G.; LIMA, A. G. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae).

**Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.13, n.2, p. 156-162, 2018.

GRZYWACZ, D.; MOORE, S., 2017. Production, formulation, and bioassay of baculoviruses for pest control. In: Lacey, L.A. (Ed.), **Microbial Control of Insect and Mite Pests. From Theory to Practice**. Academic Press, San Diego, CA, p. 109–124.

HARRISON, R. L.; HERNIOU, E. A.; JEHLE, J. A.; THEILMANN, D. A.; BURAND, J. P.; BECNEL, J. J.; KRELL, P. J.; OERS, M. M. V.; MOWERY, J. D.; BAUCHAN, G. R. ICTV virus taxonomy profile: Baculoviridae. **Journal of General Virology**, v.99, p.1185-1186, 2018.

HRUSKA, A.; GOULD, F. Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea lineolata* (Lepidoptera: Pyralidae): Impact of Larval Population Level and Temporal Occurrence on Maize Yield in Nicaragua. **Journal of Economic Entomology**, v.90, p.611-622, 1997.

HUSSAIN, A.G.; WENNMANN, J.T.; GOERGEN, G.; BRYON, A.; ROS, V.I.D. Viruses of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*: A Review with Prospects for Biological Control. **Viruses**, v. 13, p. 1-21, 2021.

JING, D.P.; GUO, J.F.; JIANG, Y.Y.; ZHAO, J.Z.; SETHI, A.; HE, K.L.; WANG, Z.Y. Initial detections and spread of invasive *Spodoptera frugiperda* in China and comparisons with other noctuid larvae in cornfields using molecular techniques. **Insect Science**, v.27, n.4, p.780–790, 2020.

KUMELA, T.; SIMIYU, J.; SISAY, B.; LIKHAYO, P.; MENDESIL, E.; GOHOLE, L.; TEFERA, T. Conhecimento, percepções e práticas de manejo dos agricultores da nova praga invasora, lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) na Etiópia e no Quênia. **Internacional Journal of Pest Management**, v.65, n.1, p.1-9, 2018.

LACEY, L.A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D.I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M.S. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of invertebrate pathology**, v.132, p.1-41, 2015

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Instrução Normativa Conjunta, nº 1, de 6 de fevereiro de 2015**. Publicado no Diário Oficial da União (DOU-Seção 1) ISSN 1677-7042. Disponível em:<<http://www.in.gov.br/autenticidade.html>>. Acesso em: 12 nov. 2022.

MONTEZANO, D. G.; SPECHT, A.; SOUZA-SILVA, J. C.; SÓSA-GOMEZ, D. R.; ROQUE-SPECHT, V. F.; PAULA-MORAES, S. V. de P.; PETERSON, J. A.; HUNT, T. E. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African Entomology**, v. 26, n.2, p.286-300, 2018.

MOREIRA, H.J. da C.; ARAGÃO, F.D. **Manual de Pragas do Milho**, p.86-93. Campinas, 2009.

OMOTO, C. Lagarta-do-cartucho ou lagarta-militar, *Spodoptera frugiperda*. 2022. Disponível em: [irac-br.org/spodoptera-frugiperda](http://irac-br.org/spodoptera-frugiperda). Acesso em: 14 nov. 2022.

RAMÍREZ-ARIAS, F.G.; LASA, R.; MURILLO, R.; NAVARRO-DE-LA-FUENTE, L.; GABRIEL MERCADO, G.; WILLIAMS, T. Post-mortem incubation influences occlusion

body production in nucleopolyhedrovirus-infected larvae of *Spodoptera frugiperda*. **Biological Control**, v.135, p. 33-40, 2019.

REID, S.; MALMANCHE, H.; CHAN, L.; POPHOM, H.; VAN OERS, M.M. Production of entomopathogenic viruses. In: Morales-Ramos, J.A.; Rojas, M.G.; Shapiro-Ilan, D. I. (Eds) Mass production of beneficial organisms: invertebrates and entomopathogens. London: Academic Press is an imprint of Elsevier, 2022. p. 375-397.

SAYED, W. A. A.; EL-HELALY, A.; JAMAL, Z. A.; EL-BENDARY, H. Effect of a low cost diet on the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrosis virus pathogenicity and sterile insect technique. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v.31, n.117, p. 1-8, 2021.

SOKAME, B. M.; REBAUDO, F.; MALUSI, P.; SUBRAMANIAN, S.; KILALO, D. C.; JUMA, G.; CALATAYUD, P. A. Influence of Temperature on the Interaction for Resource Utilization between Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), and a Community of Lepidopteran Maize Stemborers Larvae. **Insects**, v.11, n.73, p. 1-17, 2020.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; MORGADO, F.S.; CORRÊA, R.F.T.; SILVA, L.A., ARDISSON-ARAÚJO, D.M.P.; RODRIGUES, B.M.P.; OLIVEIRA, E.E., AGUIAR, R.W.S.; RIBEIRO, B.M. Entomopathogenic Viruses in the Neotropics: Current Status and Recently Discovered Species. **Neotropical Entomology**, v.49, p.315–331, 2020.

SPARKS, T.C.; CROSSTHWAITE, A. J.; NAUEN, R.; BANBA, S.; CORDOVA, D.; EARLEY, F.; EBBINGHAUS-KINTSCHER, U.; FUJIOKAF, S.; HIRAO, A.; KARMONH, D.; KENNEDY, R.; NAKAOD, T.; POPHAMJ, H.J.R.; SALGADOK, V.; WATSONA, G. B.; WEDELK, B. J.; WESSELSA, F. J. Insecticides, biologics and nematicides: Updates to IRAC's mode of action classification-a tool for resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 167, p.1-10, 2020.

STINGUEL, P.; PAIVA, C.E.C.; ZUIM, V.; AZEVEDO, A.C.T.; VALICENTE, F.H.; DOS SANTOS JUNIOR, H.J.G. Optimization of In Vivo Production of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV). **Neotropical Entomology**, v.51, n.1, p.122-132, 2022.

SUBRAMANIAN, S.; SANTHARAM, G.; SATHIAH, N.; KENNEDY, J.S.; RABINDRA, R.J. Influence of incubation temperature on productivity and quality of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. **Biological Control**, v.37, n.3, p. 367-374, 2006.

USDA. Brazil: Agricultural Biotechnology Annual. 2021. Disponível em: [https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Agricultural%20Biotechnology%20Annual\\_Brasilia\\_Brazil\\_10-20-2021.pdf](https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Agricultural%20Biotechnology%20Annual_Brasilia_Brazil_10-20-2021.pdf). Acesso em: 12 nov. 2022.

VALICENTE, F.H.; TUELHER, E.S.; PENA, R.C.; ANDREAZZA, R.; GUIMARÃES, M.R.F. Cannibalism and virus production in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae fed with two leaf substrates inoculated with Baculovirus spodoptera. **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 2, p. 191-199, 2013.

VALICENTE, F.H.; TULHER, E.S. **Controle Biológico da Lagarta do Cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com baculovirus**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2009. 14p. (Circular Técnica, 114).

VALICENTE, F.H.; TULHER, E.S.; BARROS, E.C. **Processo de produção comercial de baculovírus em grande escala**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2010. 6p. (Circular Técnica, 157).

VAN BEEK, N.; DAVIS, D.C. Baculovirus insecticide production in insect larvae. **Methods in Molecular Biology**, v.338, p.367-378, 2016.

WILLIAMS, T.; BERGOIN, M.; OERS, M. M. V. Diversity of large DNA viruses of invertebrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.147, p. 4-22, 2017.

ZAMORA-AVILÉS, N.; MARTÍNEZ, A.M.; PINEDA, S.; BRAVO-PATIÑO, A.; FIGUEROA, I.; LASA, R. Cool-textured diets for use in baculovirus production. **Biocontrol Science and Technology**, v.27, n.11, p. 1327-1338, 2017.

## 2 CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO DE ESTÁGIO LARVAL DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM TEMPERATURAS SOB CONDIÇÃO PADRONIZADA<sup>1</sup>

### RESUMO

A *Spodoptera frugiperda* conhecida como lagarta do cartucho, é um inseto bem estudado no Brasil e no mundo. Para o desenvolvimento das pesquisas e ensaios laboratoriais é necessário a multiplicação massal, e, para a padronização do mesmo, é importante determinar a quantidade e duração dos ínstares larvais. A quantidade de ínstar é influenciada por vários fatores, dentre os quais a temperatura, qualidade e quantidade de alimentos, bem como as condições padronizadas de multiplicação, como por exemplo a dieta artificial. Com intuito de obter mais informações sobre a relação da dieta artificial e a temperatura, estudou-se o número e a duração dos ínstares larvais de *S. frugiperda* em quatro temperaturas visando proporcionar informações para produção *in vivo* do baculovírus de *S. frugiperda*. O bioensaio foi desenvolvido em câmara climatizada nas diferentes temperaturas, cujo lagartas recém-eclodidas foram alimentadas com dieta artificial. Diariamente foram retiradas 10 lagartas de cada tratamento para medições da largura da cápsula cefálica. O desenvolvimento do inseto seguiu a regra de Dyar, variando de cinco a sete ínstares e a duração larval entre 11 a 17 dias.

**Palavras chave:** Dieta artificial. Ínstar larval. Lagarta do cartucho.

---

<sup>1</sup> Artigo publicado: Revista em Agronegócio e Meio Ambiente, v. 15, n. 4, 2022.doi: 10.17765/2176-9168.2022v15n4e9668

## LARGE STAGE DEVELOPMENT OF *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) IN TEMPERATURES UNDER STANDARD CONDITION

### ABSTRACT

*Spodoptera frugiperda*, known as the fall armyworm, is a well-studied insect in Brazil and worldwide. For the development of research and laboratory tests, mass creation is necessary, and for its standardization, it is important to determine the quantity and duration of the larval instars. The amount of urge is influenced by several factors, including temperature, quality and quantity of food, as well as standardized rearing conditions, such as the artificial diet. In order to obtain more information about the relationship between the artificial diet and temperature, the number and duration of *S. frugiperda* larval instars at four temperatures were studied. The experiment was carried out in an air-conditioned chamber at different temperatures, whose newly hatched larvae were fed an artificial diet. Ten larvae were taken daily from each treatment to measure the width of the head capsule. The development of the insect followed Dyar's rule, ranging from five to seven instars and the larval duration between 11 and 17 days.

**Keywords:** Artificial diet. Cannibalistic behavior. Fall armyworm.

## 2.1 INTRODUÇÃO

A lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), é um inseto-praga bem estudado no mundo, devido principalmente à dispersão e a diversidade de hospedeiros dos quais alimenta-se e pode ocasionar prejuízos à produção (VILARINHO et al., 2011; SILVA et al., 2017; FAN et al., 2020; SUBY et al., 2020). No Brasil, em um levantamento feito por Montezano et al. (2018), foram identificadas 82 novas espécies de plantas hospedeiras de *S. frugiperda*. Trata-se de uma espécie praga importante que é necessário melhorar a compreensão quanto a biologia e manejo (MONTEZANO et al., 2018).

Entretanto, para que pesquisas sejam conduzidas e ensaios realizados é necessário a multiplicação massal em laboratório. A multiplicação de insetos em laboratório permite estabelecer uma condição padronizada quanto ao controle da temperatura, umidade e fotoperíodo favorecendo uma uniformidade dos insetos multiplicados. O número de ínstaes larvais é variável e em diversos trabalhos verificam-se informações sobre a biologia de *S. frugiperda*, principalmente em substratos *in natura*, quanto a duração do ciclo de vida (ESPERK; TAMMARU; NYLIN, 2007; PINHEIRO et al., 2008; MONTEZANO et al., 2019; DU PLESSIS; SCHLEMMER; VAN DEN BERG, 2020). Contudo, para *S. frugiperda*, são poucos estudos que demonstram a duração de cada ínstar durante o estágio larval em dieta artificial e quantos ínstaes são possíveis de ocorrer em determinada temperatura de multiplicação.

Alguns fatores mais comuns que influenciam o número de ínstaes são a temperatura, fotoperíodo, qualidade e quantidade de alimentos, umidade, densidade de insetos por recipiente, condições físicas, heranças e sexo (ESPERK; TAMMARU; NYLIN, 2007). Além disso, dentre a alimentação oferecida em condições padronizadas de multiplicação, a dieta artificial, é um fator que interfere no número de ínstaes, reforçando-se a necessidade de estudos investigativos nesse viés que deem base segura para aplicações em ensaios que requer essas informações (MURÚA; VIRLA; DEFAGÓ, 2003; ESPERK; TAMMARU; NYLIN, 2007; SILVA et al., 2017; MONTEZANO et al., 2019; FERNANDES et al., 2020).

Essas informações peculiares da fase larval são de interesse para o estudo laboratorial, possibilitando o desenvolvimento de pesquisas que implementem o manejo integrado de pragas (MONTEZANO et al., 2019). Esse estudo complementa

as contribuições anteriores de desenvolvimento larval de *S. frugiperda* em dieta artificial (MURÚA; VIRLA; DEFAGÓ, 2003), forragens (SANTOS et al., 2003; FERNANDES et al., 2020) e submetidos em diferentes temperaturas (ALI; LUTTRELL; SCHNEIDER, 1990; DU PLESSIS; SCHLEMMER; VAN DEN BERG, 2020). Portanto, pressupõe-se que a alimentação em condições padronizadas de multiplicação, como a dieta artificial, submetidas a diferentes temperaturas interferem na duração da fase larval e no número de ínstaes.

Dessa forma, são necessárias informações referentes à duração da fase larval em dias e a relação com o ínstar larval e a temperatura para multiplicação em dieta artificial. Assim, o objetivo foi determinar o número de ínstaes, e a duração em dias de cada ínstar de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial em condição padronizada de multiplicação sob diferentes temperaturas visando disponibilizar informações que aprimorem a produção *in vivo* de vírus entomopatogênicos.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios foram conduzidos no Setor de Entomologia do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI) localizado no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE/UFES).

### 2.2.1 Multiplicação massal e manutenção de *S. frugiperda*.

A multiplicação e manutenção de *S. frugiperda* foram realizadas em condições padronizadas em sala climatizada a temperatura de  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa de 60% e fotofase de 12 horas. Os adultos foram mantidos em gaiola de PVC alimentados por meio de algodão embebido em solução de sacarose a 10%. Para a oviposição, foram utilizadas folhas de papel branco recobrando o interior das gaiolas, sendo retiradas a cada dois dias para a remoção das posturas. As posturas foram mantidas em potes plásticos transparentes até a eclosão dos neonatos. Estes foram transferidos com o auxílio de um pincel de cerdas macias para recipientes plásticos (100 mL) contendo dieta artificial adaptada à base de feijão carioca, gérmen de trigo, levedura de cerveja e caragenina descrita por Nalim (1991), permanecendo por cinco



dias. Posteriormente foram transferidas aproximadamente 40 lagartas para recipiente de acrílico tipo gerbox<sup>®</sup> (dimensões de 11 x 11 x 3 cm) e após 10 dias foram individualizadas em gerbox<sup>®</sup> (3 cm diâmetro) até a formação de pupa. Com a emergência dos adultos, os mesmos foram transferidos para as gaiolas de multiplicação, dando continuidade ao ciclo.

### **2.2.2 Determinação do desenvolvimento de *S. frugiperda* em temperaturas sob condição padronizada.**

Para a realização do bioensaio, visando à obtenção de insetos em diferentes estádios de desenvolvimento, lagartas recém eclodidas de *S. frugiperda* provenientes da criação massal do laboratório foram transferidas, individualmente, para recipiente tipo gerbox<sup>®</sup> (6 cm diâmetro) contendo pedaços de dieta artificial. Lotes de insetos, aproximadamente 300 lagartas/temperatura, foram separados e acondicionados em câmaras climatizadas reguladas nas temperaturas de 22, 25, 28 e 31 ± 1 °C; fotofase de 12 horas; umidade relativa (UR) de 70 ± 10%. Diariamente, dez lagartas de cada uma das temperaturas foram coletadas e mortas em álcool 70%. Posteriormente, foram medidas as larguras das cápsulas cefálicas com o auxílio de uma ocular graduada, acoplada a um microscópio estereoscópio. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e a determinação do número de ínstaes e a respectiva razão de crescimento foram baseados no modelo matemático com base na regra de Dyar (PARRA; HADDAD, 1989). Para decisão da seleção dos ínstaes foi selecionada a hipótese conforme: i) não sobreposição dos intervalos de confiança para as médias de largura da cápsula cefálica; ii) maior valor do coeficiente de determinação da regressão linear (R<sup>2</sup>); iii) concordância do valor estimado da razão de crescimento (K) em relação ao intervalo de variação de K proposto por Dyar (1890).

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A partir das curvas de distribuição multimodal da largura das cápsulas cefálicas de *S. frugiperda* alimentadas em dieta artificial nas temperaturas de 22, 25, 28 e 31 ± 1 °C foi possível perceber que existe uma influência importante da temperatura na fase de duração larval (Figuras 1, 2, 3 e 4).

Na tabela 1 é possível observar que com base nas hipóteses estabelecidas para avaliação da distribuição multimodal foi possível estimar a quantidade de ínstaes em cada uma das temperaturas analisadas. Percebe-se que não houve sobreposição dos intervalos de confiança (IC) e que o valor do coeficiente de determinação da regressão linear ( $R^2$ ) variou de 0,83 a 0,97, apresentando em todas as temperaturas uma boa estimativa. Também houve a concordância do valor estimado da razão de crescimento (K). O valor médio da razão de crescimento (K) encontrada no presente trabalho para as temperaturas de 22, 25, 28 e 31  $\pm$  1  $^{\circ}$ C foi, respectivamente, de: 1,51; 1,47; 1,34; e 1,31, e os mesmos estão dentro da faixa de aceitação do intervalo de variação de K proposto por Dyar (1890), que varia de 1,1 a 1,9 (PARRA; HADDAD, 1989).

A temperatura de 25  $\pm$  1  $^{\circ}$ C, que é considerada padrão para a criação dos insetos em laboratório, apresentou cinco ínstaes (Figura 2), corroborando com o estudo de Ali, Luttrell e Schneider (1990), enquanto que Montezano et al. (2019) e Capinera (2020) constataram seis ínstaes nessa mesma temperatura. Diversos fatores influenciam na determinação do número de ínstar, para *S. frugiperda* os principais são: qualidade dos alimentos, temperatura e variação dentro das condições padronizadas de criação (ESPERK; TAMMARU; NYLIN, 2007).

No presente trabalho foi possível verificar que à medida que a temperatura diminuía ou aumentava houve a observação do aumento do número de ínstaes, chegando a sete ínstaes na temperatura de 31  $\pm$  1  $^{\circ}$ C (Figura 4). Em outros trabalhos também foi demonstrado que os extremos de temperatura aumentam o número de ínstaes, sendo que a 38  $^{\circ}$ C foi constatada mortalidade de lagartas no quarto ínstar (ALI; LUTTRELL; SCHNEIDER, 1990; MONTEZANO *et al.*, 2019). O resultado encontrado na temperatura de 31  $\pm$  1  $^{\circ}$ C foi interessante, pois apesar da duração da fase larval de 11 dias, a capacidade de crescimento mais acelerado em função do aumento da temperatura favorecia ecdises e aumento da cápsula cefálica com maior frequência (Tabela 1 e Figura 5). Isso pode ser comprovado até mesmo pela duração da fase larval, em que larvas de 2 $^{\circ}$ , 4 $^{\circ}$ , 5 $^{\circ}$  e 6 $^{\circ}$  ínstaes foram de apenas 1 dia, e as variações do tamanho da capa cefálica nessas 24 horas foram de 0,8 a 1,2 mm para o 4 $^{\circ}$  ínstar, 1,3 a 1,8 mm para o 5 $^{\circ}$  ínstar, enquanto que o 2 $^{\circ}$  e o 6 $^{\circ}$  ínstar mantiveram-se com 0,5 mm e 1,9 mm, respectivamente (Tabela 1 e Figura 5). Em temperaturas mais baixas (22  $\pm$  1  $^{\circ}$ C) esse aumento no número de ínstaes, em relação à temperatura padrão (25  $^{\circ}$ C), pode ser explicado por uma maior duração do tempo

larval, estendendo-se por 17 dias (Tabela 1 e Figura 5). Em geral, temperaturas mais baixas atrasam o desenvolvimento larval (DU PLESSIS; SCHLEMMER; VAN DEN BERG, 2020). Resultado semelhante foi encontrado por Du Plessis, Schlemmer e Van den Berg (2020) em lagartas de *S. frugiperda* criadas com grãos de milho doce, que constataram também uma maior duração dos ínstaes larvais em temperaturas mais baixas.

Além da temperatura, plantas hospedeiras menos adequadas para a alimentação podem prolongar o desenvolvimento larval, atingindo entre cinco a dez ínstaes (SANTOS et al., 2003; MURÚA; VIRLA; DEFAGÓ, 2003; MONTEZANO et al., 2019). Em condições de campo, geralmente encontra-se apenas uma lagarta por planta, e a duração larval pode chegar a 30 dias em folhas de milho (MOREIRA; ARAGÃO, 2009). Podemos perceber que além da temperatura influenciar na duração do desenvolvimento larval, tal como apresentado na Figura 5 (22 °C - 17 dias; 25 °C - 15 dias; 28 e 31 °C - 11 dias), o substrato alimentar também é outro fator importante.

A qualidade nutricional está relacionada com o substrato alimentar e interfere no desenvolvimento larval, impedindo até mesmo de atingir a fase adulta como *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) ao alimentar-se de azevém e cornichão (BARROS; TORRES; BUENO, 2010; SILVA et al., 2017; FERNANDES et al., 2020). Em alguns casos uma maior duração do período larval é uma maneira de compensar a baixa qualidade nutricional do alimento e prolongar o consumo até que atinja fase de pupa (SILVA et al., 2017). Além de empregar isso como tática de manejo cultural utilizando-se espécies que apresentam qualidade nutricional reduzida para auxiliar na supressão da praga, como por exemplo, rotacionar o cultivo com o azevém, pois apresenta baixa capacidade de colonização por insetos e interfere no desempenho do ciclo biológico (FERNANDES et al., 2020).

No presente trabalho optou-se por trabalhar com dieta artificial para inferir a duração larval em dias no intuito de auxiliar a pesquisa em laboratório. A dieta usada nesse ensaio é a descrita por Nalim (1991) à base de feijão, germe de trigo e levedura de cerveja, no trabalho de Silva et al. (2017) usaram para o ensaio a dieta proposta por Greene; Leppla; Dickerson (1976), e podemos constatar que até mesmo em dieta artificial, cujo contém os nutrientes adequados para o desenvolvimento, pode haver variações na duração da fase larval, reforçando a necessidade do presente estudo.

Outra variação foi em relação ao intervalo dos ínstaes (Tabela 1) que em média atingiram no mínimo 0,29 mm de espessura inicial a 2,548 mm (CORRETO é

2,587mm média de 31°C) de espessura final, variando conforme a temperatura na qual os indivíduos estavam condicionados. Pode-se perceber ainda que a variação no número de estágios e a duração do período larval indicam que o aumento no número de ínstars não provém de uma divisão de estágios já existentes, mas de acréscimos de novos estágios larvais. Outra informação interessante é a duração em dias de cada ínstar larval (Figura 5). Essa informação é importante para aplicar a bioensaios laboratoriais, uma vez que em termos acadêmicos a palavra ínstar é muito utilizada, esclarecendo assim, quantos dias são necessários em determinada temperatura e alimentando-se de uma dieta específica para atingi-lo. Um exemplo é em ensaios experimentais com microrganismos entomopatogênicos, como baculovírus, cujo é empregado dias de desenvolvimento larval e não ínstar (VALICENTE et al., 2013; MACHADO et al., 2021). Isso ocorre pois em muitas biofábricas o entendimento de dias após a eclosão dos ovos facilita a compreensão dos funcionários, no entanto para pesquisadores o emprego de ínstar larval é mais usual. Esse trabalho permite esclarecer a duração larval em dias em função dos ínstars conforme a temperatura empregada na criação, promovendo esclarecimentos para aplicação da pesquisa em criação massal.

#### **4 CONCLUSÃO**

O desenvolvimento da fase larval de *S. frugiperda* seguiu a regra de Dyar. Houve interferência da temperatura de multiplicação na duração e quantidade de ínstars larvais sob condição padronizada de alimentação com dieta artificial. Nas temperaturas avaliadas variou de cinco a sete ínstars e a duração larval entre 11 a 17 dias.

A temperatura padrão de multiplicação massal é 25 °C e, na dieta estudada, apresentou cinco ínstars com duração total de 15 dias de fase larval, sendo três dias no 1º ínstar; quatro dias para o 2º ínstar; dois dias para o 3º ínstar; e três dias para o 4º e para o 5º ínstar.

#### **5 REFERÊNCIAS**

ALI, A.; LUTTRELL, R. G.; SCHNEIDER, J. C. Effects of Temperature and Larval Diet on Development of the Fall Army worm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of The Entomological Society of America**, v. 83, n. 4, p. 725-733, 1990.

BARROS, E. M.; TORRES, J.B.; BUENO, A. F. Oviposição, Desenvolvimento e Reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em Diferentes Hospedeiros de Importância Econômica. **Neotropical Entomology**, v. 39, n.6, p. 996-1001, 2010. DOI:

ESPERK, T.; TAMMARU, T.; NYLIN, S. Intraspecific variability in number of larval instars in insects. **Journal of Economic Entomology**, v. 100, n.3, p. 627-645, 2007.

FAN, J.; WU, P.; TIAN, T.; REN, Q.; HASEEB, M.; ZHANG, R. Potential Distribution and Niche Differentiation of *Spodoptera frugiperda* in Africa. **Insects**, v.383, n.11, 2020.

FERNANDES, F. O.; ABREU, J. A. DE.; CHRIST, L. M.; ROSA, A. P. S. A. DA; MENDES, S. M. Development of *Helicoverpa armigera* Hübner, 1805 and *Spodoptera frugiperda* Smith, 1797 in winter forages. **Bioscience Journal**, v. 36, n.3, p. 844-856, 2020.

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean Larvae: A Rearing Procedure and Artificial Medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

MACHADO, L. C.; SANTOS JUNIOR, H. G. dos; MAURI, L. V. R.; GUILHEN, J. H. S.; PAIVA, C. E. C. Aperfeiçoamento da técnica de produção massal *in vivo* de Baculovirus *spodoptera*. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 14, n. 3, 2021.

MONTEZANO, D. G.; SPECHT, A.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROQUE-SPECHT, V. F.; SOUSA-SILVA, J. C.; PAULA-MORAES, S. V.; PETERSON, J. A.; HUNT, T. E. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African Entomology**, v. 26, n. 2, p.286-300, 2018.

MONTEZANO, D. G.; SPECHT, A.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROQUE-SPECHT, V. F.; PAULA-MORAES, S. V.; PETERSON, J. A.; HUNT, T. E. Developmental Parameters of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Immature Stages Under Controlled and Standardized Conditions. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 8, p. 76-89, 2019.

MOREIRA, H.J. da C.; ARAGÃO, F.D. Manual de Pragas do Milho, p.100-101. Campinas, 2009.

MURÚA, M. G.; VIRLA, E. G.; DEFAGÓ, V. Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, v. 29, p. 43-51, 2003.

NALIM, D. M. Biologia, nutrição quantitativa e controle de qualidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais. 1991. 150f. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-

Graduação em Entomologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1991.

PARRA, R.P.P.; HADDAD, M.L. Determinação do número de ínstaes de insetos. Piracicaba: FEALQ, 1989, 49p.

PINHEIRO, J. C. A.; PÁDUA, L. E. DE M.; PORTELA, G. L. F.; BRANCO, R. T. P. C.; REIS, A. S. DOS.; SILVA, P. R. R. Biologia comparada de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) visando ao seu zoneamento ecológico no Estado do Piauí. **Revista Caatinga**, v. 21, n.2, p. 197-203, 2008.

PLESSIS, H. D.; SCHLEMMER, M.L.; BERG, J. V. D. The effect of temperature on the development of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insects**, v. 228, n.11, p. 1-11, 2020.

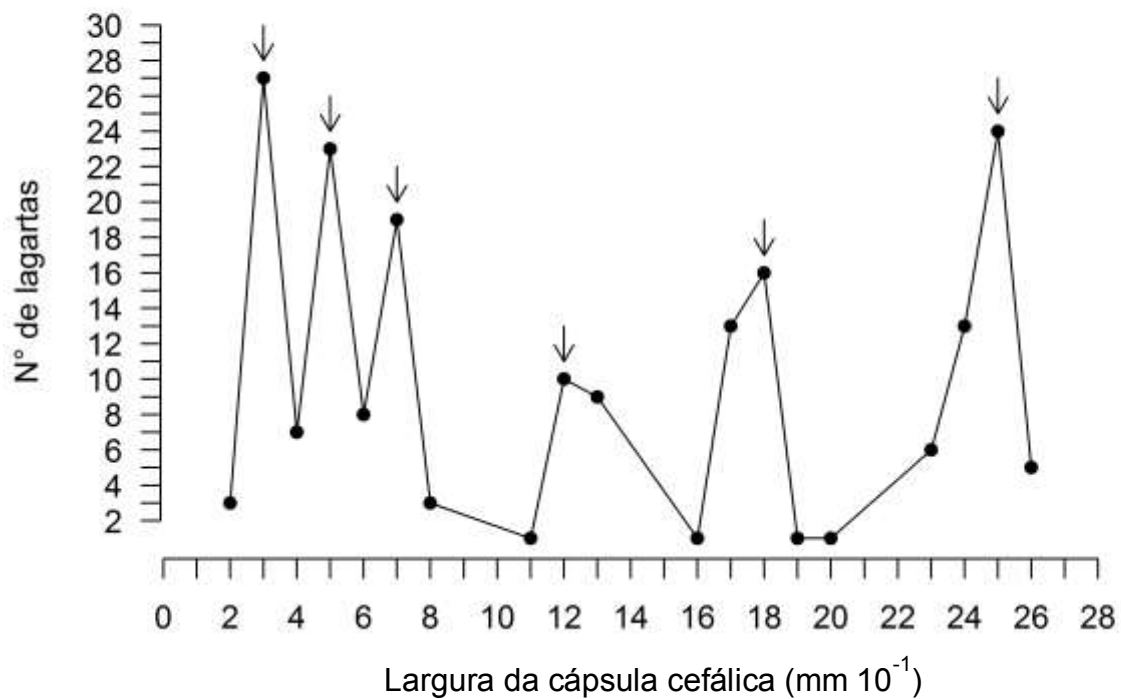
SANTOS, L. M.; REDAELLI, L. R.; DIEFENBACH, L. M. G.; EFROM, C. F. S. Larval and pupal stage of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in sweet and field corn genotypes. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, n. 4, p. 627-633, 2003.

SILVA, D. M. DA; BUENO, A. DE F.; STECCA, C. DOS S.; ANDRADE, K.; NEVES, P. M. O. J.; OLIVEIRA, M. C. N. DE O. Biology of *Spodoptera eridania* and *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants. **Florida Entomologist**, v. 100, n. 4, p. 752-760, 2017. DOI:

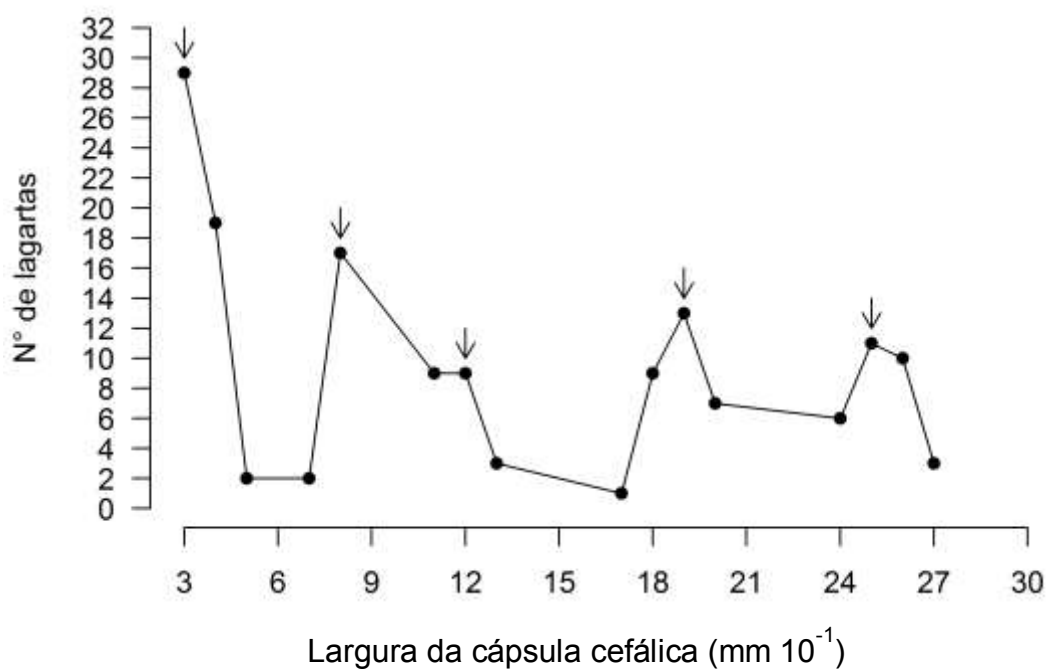
SUBY, S. B.; SOUJANYA, P. L.; YADAVA, P.; PATIL, J.; SUBAHARAN, K.; PRASAD, G. S.; BABU, K. S.; JAT, S. L.; YATHISH, K. R. J.; VADASSERY, J.; KALIA, V. K.; BAKTHAVATSALAM, N.; SHEKHAR, J. C.; RAKSHIT, S. Invasion of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in India: nature, distribution, management and potential impact. **Current Science**, v. 119, n.1, p. 44-51, 2020.

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. S.; PENA, R. C.; ANDREAZZA, R.; GUIMARÃES, M. R. F. Cannibalism and virus production in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae fed with two leaf substrates inoculated with Baculovirus spodoptera. **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 2, p. 191-199, 2013.

VILARINHO, E. C.; FERNANDES, O. A.; HUNT, T. E.; CAIXETA, D. F. Movement of *Spodoptera frugiperda* adults (Lepidoptera: Noctuidae) in maize in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 94, n. 3, p. 480-488, 2011.

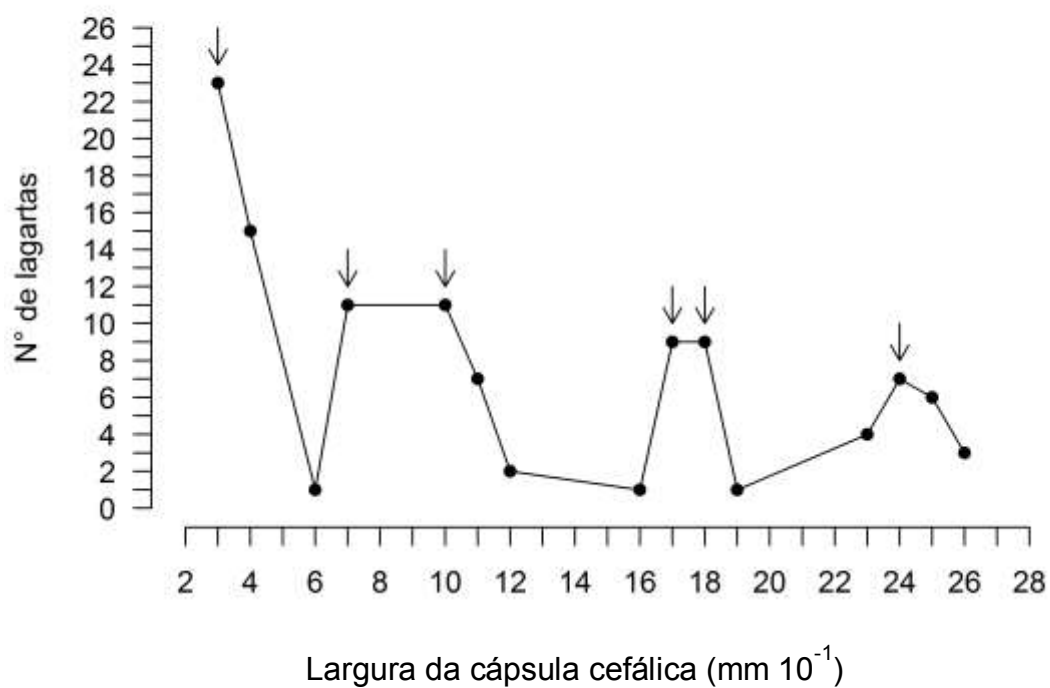


**Figura 1** - Curva de distribuição multimodal da largura das cápsulas cefálicas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em dieta artificial sob temperatura de  $22 \pm 1$  °C. Fotofase: 12h e UR:  $70 \pm 10\%$ .

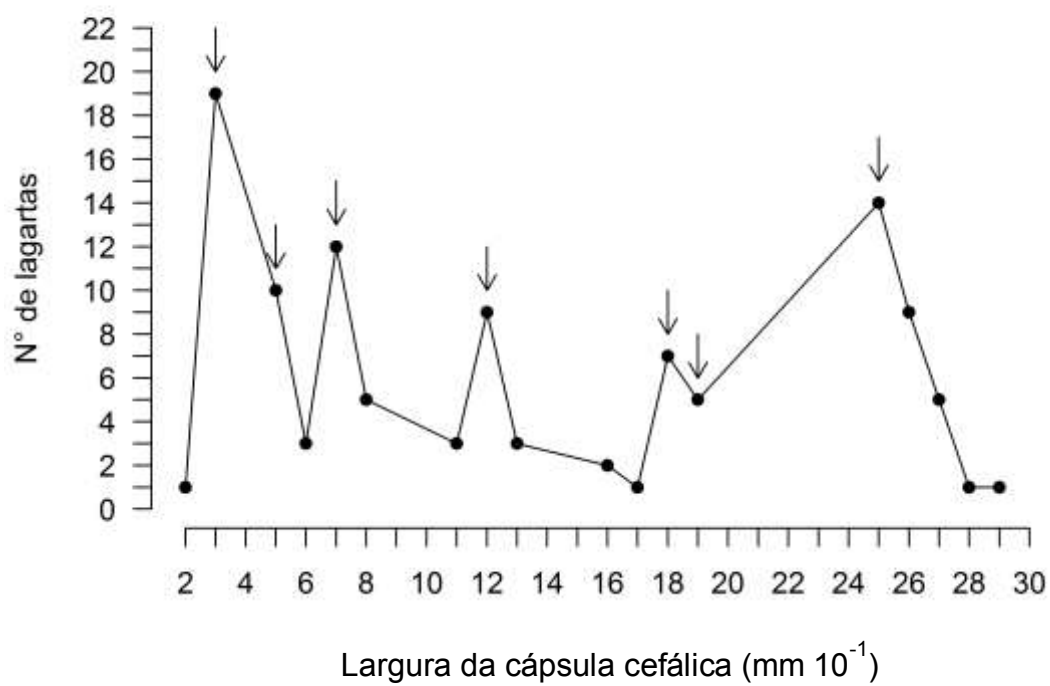


**Figura 2** - Curva de distribuição multimodal da largura das cápsulas cefálicas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em dieta artificial sob temperatura de  $25 \pm 1$  °C. Fotofase: 12h e UR:  $70 \pm 10\%$ .





**Figura 3** - Curva de distribuição multimodal da largura das cápsulas cefálicas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em dieta artificial sob temperatura de  $28 \pm 1$  °C. Fotofase: 12h e UR:  $70 \pm 10\%$ .

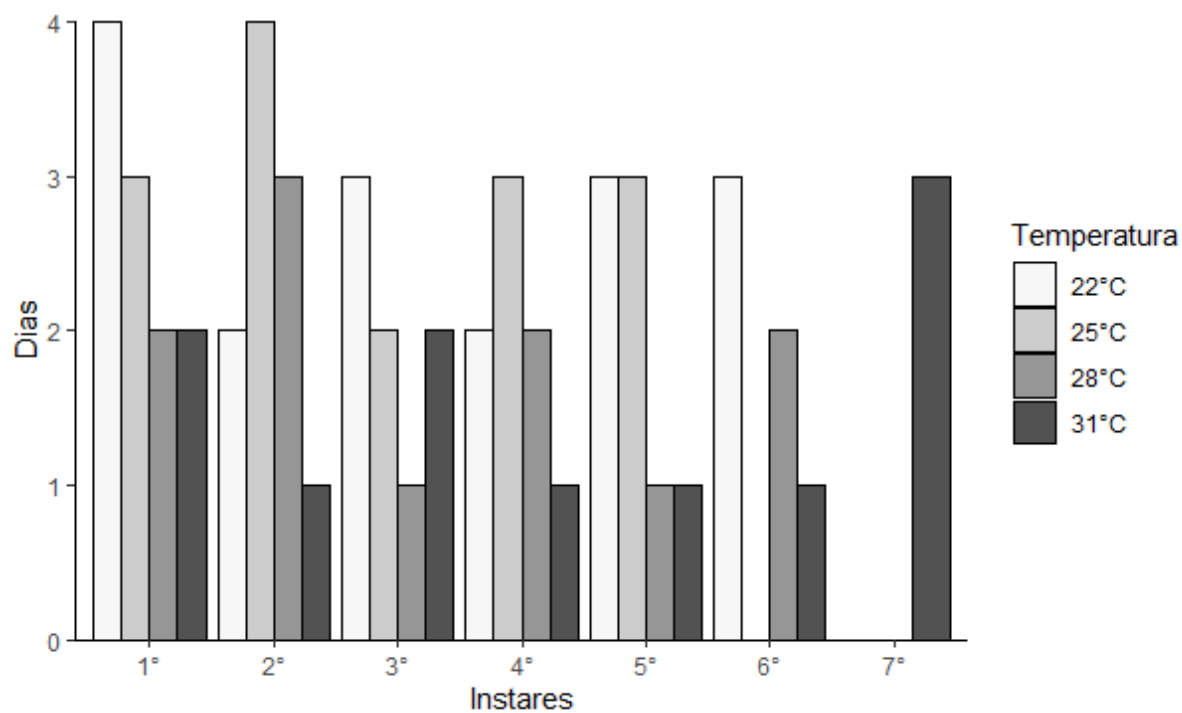


**Figura 4** - Curva de distribuição multimodal da largura das cápsulas cefálicas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em dieta artificial sob temperatura de  $31 \pm 1$  °C. Fotofase: 12h e UR:  $70 \pm 10\%$ .

**Tabela 1** - Largura das cápsulas cefálicas de lagartas de *Spodoptera frugiperda* multiplicadas em dieta artificial sob as temperaturas de 22, 25, 28 e 31 ± 1 °C. Fotofase: 12h e UR: 70 ± 10%.

Ínstar	Largura					
	22 °C			25 °C		
	Iv <sup>1</sup>	Média	IC <sup>2</sup> (P<0,05)	Iv <sup>1</sup>	Média	IC <sup>2</sup> (P<0,05)
	mm (10 <sup>-1</sup> )					
I	2,00 - 3,00	2,90	2,79 - 3,01	3,00 - 3,00	3,00	3,00 - 3,00
II	4,00 - 5,00	4,77	4,61 - 4,93	4,00 - 8,00	5,90	5,28 - 6,52
III	6,00 - 7,00	6,70	6,52 - 6,89	11,00 - 12,00	11,50	11,24 - 11,76
IV	8,00 - 12,00	11,07	10,10 - 12,04	13,00 - 19,00	17,88	17,20 - 18,64
V	13,00 - 18,00	16,46	15,82 - 17,10	20,00 - 27,00	24,32	23,57 - 25,08
VI	19,00 - 26,00	24,38	24,01 - 24,75	-	-	-
VII	-	-	-	-	-	-
R <sup>2</sup>	0,97			0,93		
K	1,51			1,47		
Ínstar	Largura					
	28 °C			31 °C		
	Iv <sup>1</sup>	Média	IC <sup>2</sup> (P<0,05)	Iv <sup>1</sup>	Média	IC <sup>2</sup> (P<0,05)
	mm (10 <sup>-1</sup> )					
I	3,00 - 3,00	3,00	3,00 - 3,00	2,00 - 3,00	2,95	2,85 - 3,05
II	4,00 - 7,00	5,30	4,71 - 5,89	5,00 - 5,00	5,00	5,00 - 5,00
III	10,00 - 10,00	10,00	10,00 - 10,00	6,00 - 7,00	6,80	6,57 - 7,03
IV	11,00 - 17,00	14,21	12,80 - 15,63	8,00 - 12,00	10,65	9,72 - 11,57
V	18,00 - 18,00	18,00	18,00 - 18,00	13,00 - 18,00	16,46	15,19 - 17,73
VI	19,00 - 26,00	24,14	23,45 - 24,84	19,00 - 19,00	19,00	19,00 - 19,00
VII	-	-	-	25,00 - 29,00	25,87	25,48 - 26,26
R <sup>2</sup>	0,83			0,92		
K	1,34			1,31		

\*<sup>1</sup>Iv - Intervalo de variação; <sup>2</sup>IC - Intervalo de confiança.



**Figura 5** - Tempo médio de cada instar larval de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em dieta artificial sob as temperaturas de 22, 25, 28 e 31 ± 1°C. Fotofase: 12h e UR: 70 ± 10%.

### 3 CAPÍTULO II: CANIBALISMO NOS ÍNSTARES LARVAIS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE): TEMPERATURA E DISPONIBILIDADE DE ALIMENTO<sup>2</sup>

#### RESUMO

O canibalismo é um comportamento frequente em lagartas de *Spodoptera frugiperda* seja a campo ou em laboratório. A proposta desse trabalho foi investigar os fatores temperatura e disponibilidade de alimento no comportamento canibal em ínstares desse inseto em condições laboratoriais. Lagartas recém eclodidas foram acondicionados nas temperaturas de 22, 25, 28 e 31 ± 1 °C. Quando atingiam o 3°, 4° e 5° ínstar, as lagartas em grupo de 20 indivíduos/gerbox<sup>®</sup> foram transferidas conforme a disponibilidade de alimento: 0, 5, 10, 15 e 20 g de dieta artificial. O canibalismo foi avaliado após 72 horas. Em todos os ínstares avaliados as lagartas apresentaram comportamento canibal em função da temperatura de disponibilidade de alimento. A quantidade de 15g de dieta artificial é adequado para evitar o canibalismo de lagartas de 3 e 4° ínstar em 72h, independente da temperatura. Para o 5° ínstar essa quantidade é equivalente a 10g.

**Palavras chave:** Dieta artificial. Comportamento canibal. Lagarta do cartucho.

---

<sup>2</sup>Artigo publicado: Acta Scientiarum. Biological Sciences. v. 44, 2022. doi: 10.4025/actascibiols.v44i1.59401

**CANNIBALISM IN THE LARVAL INSTARS OF *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE): TEMPERATURE AND FOOD AVAILABILITY**

**ABSTRACT**

Cannibalism is a frequent behavior in *Spodoptera frugiperda* larvae either in the field or in the laboratory. The purpose of this work was to investigate the factors temperature and food availability on the cannibal behavior in instars of this insect under laboratory conditions. Freshly hatched larvae were conditioned at temperatures of 22, 25, 28 and  $31 \pm 1$  °C. When they reached the 3rd, 4th and 5th instar, the larvae in groups of 20 individuals/gerbox<sup>®</sup> were transferred according to food availability: 0, 5, 10, 15 and 20 g of artificial diet. Cannibalism was evaluated after 72 hours. In all the instars evaluated, the larvae showed cannibalistic behavior as a function of the temperature of food availability. The amount of 15g of artificial diet is adequate to prevent cannibalism of 3rd and 4th instar larvae within 72h, regardless of temperature. For the 5th instar this amount is equivalent to 10g.

**Keywords:** Artificial diet. Cannibalistic behavior. Fall Armyworm.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O canibalismo é caracterizado como o ato de matar e alimentar-se, seja total ou parcial, de um coespecífico (FOX, 1975; RICHARDSON, et al., 2010). Existem algumas ordens de inseto que são naturalmente canibais (“carnívoros”), como Mantodea, Odonata e Neuroptera (RICHARDSON, et al., 2010). Porém, existem insetos que são herbívoros e manifestam esse comportamento. E dos insetos que não são canibais (“não-carnívoros”) e expressam esse comportamento destacam-se a ordem Lepidoptera e Coleoptera, representando juntas em torno de 75,3% (RICHARDSON, et al., 2010). Dentro dos lepidópteros a família Noctuidae destaca-se em relação as demais no predomínio de canibalismo na fase larval (RICHARDSON, et al., 2010).

A espécie *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) é um desses insetos que pertencem a família Noctuidae, na fase larval é herbívora e apresenta esse comportamento (ANDOW et al., 2015; BENTIVENHA et al., 2016; SOKAME et al., 2020). O canibalismo é um comportamento frequente em lagartas de *S. frugiperda* seja a campo ou em laboratório (CHAPMAN et al., 2000; BENTIVENHA et al., 2017). Contudo apesar de frequente, parece não ser obrigatório como descreve Silva & Parra (2013) apontando um método de criação em grupos com 90% de sobrevivência larval. Condições de alimentação limitada e espaço reduzido são discutidos por impulsionar a manifestação do comportamento (BENTIVENHA et al., 2016; BENTIVENHA et al., 2017). A procura pelo complemento de água e/ou nutrientes pode ser uma consequência para os indivíduos canibalizar-se (JOYNER; GOULD, 1985; VANGANSBEKE et al., 2014).

Outros fatores como: condições abióticas (temperatura, umidade); assincronia com a planta hospedeira; disponibilidades de insetos vulneráveis também podem desencadear o canibalismo (RICHARDSON, et al., 2010). Em condições laboratoriais, fatores como: a disponibilidade de alimento (quantidade e disposição), temperatura e fase de desenvolvimento foram investigadas para *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). A partir desse estudo, percebe-se que quanto maior for a complexidade de disposição de dieta para minimizar o encontro de lagartas, menor foi o canibalismo. E no terceiro instar intensificou-se a agressividade, principalmente em altas temperaturas e falta de alimento (TANG et al., 2016).

Estudo como esse é necessário para *S. frugiperda* em que há uma necessidade de individualização durante a manutenção *in vivo* em condições laboratoriais devido ao comportamento canibal. Outro exemplo da importância de conhecer o comportamento canibal e os fatores envolvidos é para a produção *in vivo* de agentes entomopatogênicos, cujo a produção massal do agente biológico requer a criação e inoculação na lagarta, como por exemplo para a produção de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) (Lefavirales: Baculoviridae) (VALICENTE; TULHER; BARROS, 2010). Logo, devido ao hábito canibal do inseto hospedeiro, faz-se necessário individualizar as lagartas, aumentando custos e o tempo de produção ao longo da cadeia produtiva (CHAPMAN et al., 2000; VALICENTE; TULHER; BARROS, 2010; DA SILVA; PARRA, 2013).

Desta forma, para o desenvolvimento dessas e outras pesquisas, são realizados bioensaios em grupos de lagartas, sendo importante conhecer o comportamento canibal em função dos fatores que podem interferir nesse hábito do inseto. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os fatores temperatura e disponibilidade de alimento no comportamento canibal em três instares de lagartas de *S. frugiperda* em condições laboratoriais visando fornecer informações à produção *in vivo* de SfMNPV.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Entomologia do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI) localizado no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE/UFES).

#### 3.2.1 Multiplicação massal e manutenção de *S. frugiperda*

A multiplicação e manutenção de *S. frugiperda* foram realizadas em condições padronizadas em sala climatizada a temperatura de  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa de 60% e fotofase de 12 horas. Os adultos foram mantidos em gaiola de PVC alimentados por meio de algodão embebido em solução de sacarose a 10%. Para a oviposição, foram utilizadas folhas de papel branco recobrando o interior das gaiolas, sendo retiradas a cada dois dias para a remoção das posturas. As posturas foram mantidas



em potes plásticos transparentes até a eclosão dos neonatos. Estes foram transferidos com o auxílio de um pincel de cerdas macias para recipientes plásticos (100 mL) contendo dieta artificial adaptada à base de feijão, gérmen de trigo, levedura de cerveja e caragenina descrita por Nalim (1991), permanecendo por cinco dias. Posteriormente foram transferidas aproximadamente 40 lagartas para recipiente de acrílico tipo gerbox<sup>®</sup> (dimensões de 11 x 11 x 3 cm) e após 10 dias foram individualizadas em gerbox<sup>®</sup> (3 cm diâmetro) até a formação de pupa. Com a emergência dos adultos, os mesmos foram transferidos para as gaiolas de multiplicação, dando continuidade ao ciclo.

### **3.2.2 Influência da temperatura e disponibilidade de alimento no hábito canibal de *S. frugiperda***

No presente estudo foi investigado os fatores temperatura e disponibilidade de alimento sob o canibalismo em três instares de lagartas de *S. frugiperda*. Para o bioensaio lagartas recém eclodidas de *S. frugiperda* provenientes da criação massal do laboratório foram acondicionados em câmaras climatizadas reguladas nas temperaturas de 22, 25, 28 e 31 ± 1 °C; fotofase de 12 horas; umidade relativa (UR) de 70 ± 10%. Quando atingiam o instar para a montagem do bioensaio, neste caso 3°, 4° e 5° instares, as lagartas em grupo de 20 indivíduos/gerbox<sup>®</sup> (dimensões de 11 x 11 x 3 cm) foram transferidas conforme a disponibilidade de alimento em 0, 5, 10, 15 e 20 g. A fonte de alimento foi a dieta artificial idêntica à usada para multiplicação massal. Para auxiliar na determinação dos estágios larvais (duração em dias x temperatura) foi realizado um estudo à parte (MACHADO et al., 2021). A figura 1 ilustra esse esquema do layout de distribuição e quantidade do alimento.

O canibalismo foi avaliado após 72 horas, quantificando-se o número de insetos sobreviventes após esse intervalo e atribuindo ao canibalismo os insetos ausentes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Para a análise fatorial, optou-se por analisar cada instar separadamente em função da disponibilidade de alimento e temperatura, perfazendo assim 20 tratamentos em cada instar avaliado num esquema fatorial (4 temperaturas x 5 quantidades de alimento). Além disso, para a análise estatística foi atribuído a esses fatores um valor absoluto, ou seja, um valor qualitativo pois o intuito é avaliar o comportamento canibal nessa

condição específica. O programa estatístico R foi utilizado para realizar as análises (R CORE TEAM, 2016).

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O canibalismo de lagartas de terceiro ínstar de *S. frugiperda* apresentou interação significativa entre a quantidade de dieta artificial e a temperatura durante 72h, procedendo-se com os desdobramentos dos fatores. Com exceção para o fator temperatura dentro dos níveis de 15 e 20g de alimento que não foram significativos, os demais apresentaram significância (Tabela 1). O canibalismo de lagartas foi maior na ausência de alimento e com aumento da temperatura, atingindo 86,25% na de 31 °C (Tabela 1). Resultado semelhante quanto a disponibilidade de alimento foi encontrado para *H. armigera* após 56 horas de avaliação, atingindo 51,67% de mortalidade nessa mesma temperatura (TANG et al., 2016). A ausência do alimento ou o complemento de água e/ou nutrientes pode ser uma consequência para os indivíduos canibalizar-se (JOYNER; GOULD, 1985; VANGANSBEKE et al., 2014).

Além disso, o canibalismo pode melhorar a aptidão dos artrópodes em ambientes naturais, fornecendo acesso a nutrientes essenciais, e, em alguns casos, esse comportamento é dependente da alimentação disponível. Um exemplo foi observado em fêmeas de *Amblydromalus limonicus* (Acari: Phytoseiidae) que depositavam um ovo e tentavam imediatamente perfurá-lo quando várias fêmeas adultas foram mantidas em ovos de *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), ovos de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) ou pólen de *Typha angustifolia* (Typhaceae), resultando em menor taxa de crescimento da população. Entretanto, quando alimentados com *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) e *Carpoglyphus lactis* (Acari: Carpoglyphidae) não exibiram comportamento canibal (VANGANSBEKE et al., 2014).

No presente trabalho, à medida que aumentava a disponibilidade de alimento, como observado nos tratamentos com 15 e 20g de dieta artificial, não houve interferência da temperatura para o canibalismo. Podemos inferir para esse ínstar a partir desse resultado que, havendo disponibilidade de alimento, o fator temperatura não influencia no comportamento canibal, conforme demonstra os resultados na Tabela 1. Apesar disso, a temperatura é um fator importante para o desenvolvimento de *S. frugiperda*, lagartas criadas em grãos de milho doce apresentaram um intervalo ideal

da fase ovo a adulto entre as temperaturas de 26 e 30 °C, constatando-se ainda que a temperatura ótima para o desenvolvimento mais rápido da fase larval e menor mortalidade foi de 30 °C e o limiar mínimo de 12,12 °C (DU PLESSIS; SCHLEMMER; VAN DEN BERG, 2020). Em condições de campo este fator determina-a como praga potencial, principalmente em clima tropical, justamente porque possuem uma ampla faixa de temperaturas e conseqüentemente alcançam uma maior distribuição pelo território (PARRA et al., 2021)

Com base no bioensaio, 15g de dieta artificial é adequado para evitar o canibalismo de lagartas de 3º ínstar dentro de 72h, independente da temperatura avaliada. Todavia, perceberemos que ao consideramos a temperatura: 22 e 28 °C a quantidade de 5g de dieta são suficientes para as 72h de avaliação; 10g para a de 25 °C e 15g para 31 °C (Tabela 1).

Quando se trata de lagartas de 4º ínstar foram observados resultados semelhantes ao ínstar anterior para o fator disponibilidade de alimento, ou seja, a ausência de alimento favorece o aumento do comportamento canibal. No entanto quantidade de 5 e 10g de dieta na temperatura de 25 °C e de 5g de dieta na temperatura de 28 °C equiparou-se a percentagem de canibalismo na ausência de alimento (Tabela 2).

Para esse mesmo ínstar, na condição de disponibilidade de alimento de 0, 5 e 10g a temperatura influenciou significativamente o comportamento canibal. Na ausência de alimento (0g) os extremos de temperatura avaliados, 22 e 31 °C, foram os que apresentaram os maiores valores de canibalismo, 70 e 65%, respectivamente. Na disponibilidade de 5g essa interferência na temperatura é observada a partir de 25 °C, variando de 17,50 a 28,75%. E para 10g destacou-se as temperaturas de 25 e 31 °C, com média em torno de 18% de canibalismo. Além disso, o comportamento canibal apresentado nos tratamentos com 15 e 20g de dieta artificial não houve interferência da temperatura (Tabela 2).

Para o quarto ínstar 5g de dieta são suficientes para um conjunto de 20 lagartas se alimentando durante 72h na temperatura de 22 e 31 °C. Para as temperaturas de 25 e 28 °C essa quantidade varia de 15g e 10g, respectivamente (Tabela 2). Outros autores verificaram que a disposição do alimento sobre o recipiente de criação também interfere nesse comportamento, onde o canibalismo é minimizado com a utilização de arranjos mais complexos na disposição da dieta artificial, como se formassem “barreiras artificiais”, havendo dificuldades para o encontro entre as

lagartas aumentando as taxas de sobrevivência (TANG et al., 2016). Diante disso, há uma possibilidade de minimizar o canibalismo na criação massal com ajustes na metodologia de multiplicação quanto a combinação de temperatura e arranjos de distribuição do alimento.

Apesar de frequente tanto em campo quanto em laboratório, o canibalismo parece não ser obrigatório como descreve Da Silva & Parra (2013) apontando um método de multiplicação em grupos com 90% de sobrevivência larval. Desta forma, pesquisas que estudam os fatores que envolvem esse hábito canibal proporcionam discussões acerca do assunto e agregam conhecimento para solucionar problemas em biofábricas, por exemplo, ou mesmo conduzir a pontos para novas pesquisas.

Em lagartas de quinto ínstar de *S. frugiperda* houve interação significativa entre a quantidade de dieta artificial e a temperatura após 72h para o canibalismo, procedendo-se com os desdobramentos dos fatores (Tabela 3). A temperatura de 25 °C foi excluída da análise, pois apresentou presença de pré-pupas durante a avaliação, isso é devido a duração total da fase larval que varia de 13 a 15 dias (MACHADO et al., 2021), e como a fase pré-pupal deixa vulnerável ao canibalismo optou-se por remover esse tratamento. Em estudo do canibalismo em outra espécie de noctuídeo, como *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), foi constatado que o momento da muda as lagartas tornavam-se mais susceptíveis aos ataques (DIAL; ADLER, 1990).

Conforme observado nos ínstars anteriores, no quinto ínstar, a ausência de alimento e o aumento de temperatura também intensificam o canibalismo, atingindo 72,50% a 31 °C. Um resultado interessante pode ser observado a partir da disponibilidade de 10g de dieta artificial cujo a temperatura não foi significativa e essa quantidade é suficiente para minimizar o canibalismo nesse ínstar. Para a *H. armigera* houve a necessidade de mais alimento para as lagartas testadas concluírem o desenvolvimento em alta temperatura (TANG et al., 2016).

Além da temperatura e a quantidade de alimento, o comportamento canibal pode ser influenciado pela qualidade nutricional do alimento e o ínstar larval (CHAPMAN et al., 1999; SIGSGAARD; GREENSTONE; DUFFIELD, 2002; RICHARDSON, et al., 2010; VANGANSBEKE et al., 2014). No presente trabalho optou-se por analisar cada ínstar separadamente em dieta artificial, contudo em outros trabalhos verificou-se que quando estavam reunidas larvas de *H. zea* de mesmo ínstar o canibalismo demorava mais para ocorrer do que quando o lote era desuniforme,

cerca de até 96h para lagartas de quinto ínstar e de apenas 6h em lotes apresentando diferentes ínstares (DIAL; ADLER, 1990). O mesmo comportamento foi observado para *S. frugiperda*, em que os valores de canibalismo foram maiores quando ocorreram interações entre larvas em diferentes estádios de desenvolvimento do que no mesmo estágio larval (BENTIVENHA et al., 2017). Além disso, para *S. frugiperda* constatou-se que o canibalismo era maior entre lagartas do quinto e sexto ínstares, que entre as dos primeiros ínstares (CHAPMAN et al., 1999).

Apesar de apresentar vantagens, o canibalismo também pode ser prejudicial, quando ao manifestar esse comportamento acabam sofrendo ferimentos por parte das presas e até mesmo infectando-se com patógenos (CHAPMAN, 1999; TANG et al., 2016; VAN ALLEN et al., 2017). Outro aspecto negativo é na multiplicação massal de insetos em condições de laboratório (TANG et al., 2016). Existe a necessidade de individualização durante a manutenção *in vivo* de *S. frugiperda* em condições laboratoriais, isso aumenta os custos e o tempo de produção ao longo da cadeia produtiva (CHAPMAN et al., 2000; VALICENTE; TULHER; BARROS, 2010; DA SILVA; PARRA, 2013).

Outro exemplo da importância de conhecer o comportamento canibal e os fatores envolvidos é para a produção *in vivo* de agentes entomopatogênicos (VALICENTE; TULHER; BARROS, 2010). Um dos principais métodos de controle biológico empregado para manejo da lagarta-do-cartucho é a utilização de vírus entomopatogênico, destacando-se o SfMNPV. Cujos a produção massal do agente biológico requer a criação e inoculação na lagarta como hospedeiro (VALICENTE; TULHER; BARROS, 2010). Estudos comportamentais envolvendo canibalismo, lagartas de *S. frugiperda* e a produção *in vivo* de baculovírus atualmente estão sendo realizados principalmente com a intenção de viabilizar a produção em larga escala (ELVIRA, WILLIAMS, CABALLERO, 2010; DA SILVA; PARRA, 2013; VALICENTE et al., 2013; MACHADO et al., 2021).

Assim, o presente estudo contribui para o direcionamento dessas e outras pesquisas que requer informações acerca dos fatores que podem interferir nesse hábito do inseto em condições laboratoriais.

### 3.4 CONCLUSÃO

No terceiro, quarto e quinto ínstar as lagartas de *S. frugiperda* apresentaram comportamento canibal em função da temperatura de disponibilidade de alimento.

No terceiro ínstar ao consideramos as temperaturas: 22 e 28 °C a quantidade de 5g de dieta artificial são suficientes para as 72h de alimentação de 20 lagartas; 10g para a de 25 °C e 15g para 31 °C.

Para o quarto ínstar 5g de dieta foram suficientes para um conjunto de 20 lagartas se alimentarem durante 72h na temperatura de 22 e 31 °C. Para as temperaturas de 25 e 28 °C essa quantidade varia de 15g e 10g, respectivamente.

A quantidade de 15g de dieta artificial é adequado para evitar o canibalismo de lagartas de 3 e 4° ínstar em 72h, independentemente da temperatura avaliada neste trabalho. Para lagartas de 5° ínstar essa quantidade é equivalente a 10g.

### 3.5 REFERÊNCIAS

ANDOW, D.A.; FARIAS, J.R.; HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, D.; NASCIMENTO, A.R.B.; OMOTO, C. Dynamics of cannibalism in equal-aged cohorts of *Spodoptera frugiperda*. **Ecological Entomology**, v.40, n.3, p.229-236, 2015.

BENTIVENHA, J. P. F.; BALDIN, E. L. L.; HUNT, T. E.; PAULA-MORAES, S. V.; BLANKENSHIP, E. E. Intraguild Competition of Three Noctuid Maize Pests. **Environmental Entomology**, p.1-10, 2016.

BENTIVENHA, J. P. F.; BALDIN, E. L. L.; MONTEZANO, D. G.; HUNT, T. E.; PAULA-MORAES, S. V. Attack and defense movements involved in the interaction of *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pest Science**, v.90, p.433-445, 2017.

CHAPMAN, J.W.; WILLIAMS, T.; ESCRIBANO, A.; CABALLERO, P.; CAVE, R.D.; GOULSON, D. Fitness consequences of cannibalism in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Behavioral Ecology**, v.10, n.3, p. 298-303, 1999.

CHAPMAN, J.W.; WILLIAMS, T.; MARTÍNEZ, A.M.; CISNEROS, J.; CABALLERO, P.; CAVE, R.D.; GOULSON, D. Does cannibalism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) reduce the risk of predation? **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.48, n.4, p. 321-327, 2000.

DA SILVA, C. S. B.; PARRA, J. R. P. New method for rearing *Spodoptera frugiperda* in laboratory shows that larval cannibalism is not obligatory. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 57, n.3, p. 347-349, 2013.

DIAL, C. I.; ADLER, P. H. Larval Behavior and Cannibalism in *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of The Entomological Society of America**, v. 83, n. 2, p. 258-263, 1990.

DU PLESSIS, H.; SCHLEMMER, M.L.; BERG, J. V. D. The effect of temperature on the development of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insects**, v. 228, n.11, p. 1-11, 2020.

ELVIRA, S.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. Juvenile hormone analog technology: effects on larval cannibalism and the production of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. **Journal of economic entomology**, v.103, n.3, p. 577-582, 2010.

FOX, L. R. Cannibalism in Natural Populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.6, p.87-106, 1975.

JOYNER, K.; GOULD, F. Developmental Consequences of Cannibalism in *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the entomological society of America**, v.78, n.1, p. 24-28, 1985.

MACHADO, L. C.; SANTOS JUNIOR, H. G. dos; SANTOS, B. A. dos; SOARES, C. O.; MAURI, L. V. R.; RODRIGUES, J. A. Desenvolvimento de estágio larval de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) em temperaturas sob condição padronizada. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 14, n. 3, 2021.

NALIM, D. M. Biologia, nutrição quantitativa e controle de qualidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais. 1991. 150f. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1991.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016.

RICHARDSON, M.L.; MITCHELL, R.F.; REAGEL, P.F.; HANKS, L.M. Causes and consequences of cannibalism in noncarnivorous insects. **Annual Review of Entomology**, v.55, p.39-53, 2010.

SIGSGAARD, L.; GREENSTONE, M. H.; DUFFIELD, S. J. Egg cannibalism in *Helicoverpa armigera* on sorghum and pigeonpea. **BioControl**, v.47, p. 151–165, 2002.

SOKAME, B. M.; REBAUDO, F.; MALUSI, P.; SUBRAMANIAN, S.; KILALO, D. C.; JUMA, G.; CALATAYUD, P. A. Influence of Temperature on the Interaction for Resource Utilization between Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), and a Community of Lepidopteran Maize Stemborers Larvae. **Insects**, v.11, n.73, p. 1-17, 2020.

TANG, T.; ZHAO, C.; XU, L.; QIU, L. Factors affecting larval cannibalism in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Oriental Insects**, v.50, n.1, p.23-33, 2016.

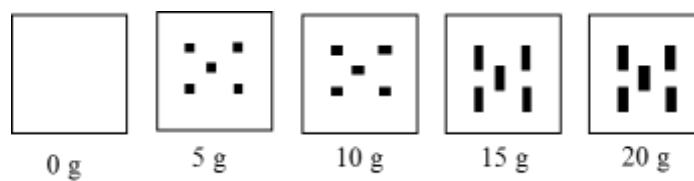
VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. S.; PENA, R. C.; ANDREAZZA, R.; GUIMARÃES, M. R. F. Cannibalism and virus production in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae fed with two leaf substrates inoculated with Baculovirus spodoptera. **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 2, p. 191-199, 2013.

VALICENTE, F.H.; TULHER, E.S.; BARROS, E.C. **Processo de produção comercial de baculovírus em grande escala**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2010. 6p. (Circular Técnica, 157).

VAN ALLEN, B. G.; DILLEMUTH, F. P.; FLICK, A. J.; FALDYN, M. J.; CLARK, D. R.; RUDOLF, V. H. W.; ELDERD, B. D. Cannibalism and Infectious Disease: Friends or Foes?. **The american naturalist**, v.190, n.3, 2017.

VANGANSBEKE, D.; NGUYEN, D. T.; AUDENAERT, J.; VERHOEVEN, J.; DEFORCE, K.; GOBIN, B.; TIRRY, L.; CLERCQ, P. DE. Diet-dependent cannibalism in the omnivorous phytoseiid mite *Amblydromalus limonicus*. **Biological Control**, v.74, p.30-35, 2014.





**Figura 1** - Esquema do layout de distribuição e quantidade de alimento usada no bioensaio de canibalismo de *S. frugiperda* em cada ínstar e temperatura. (Baseado em TANG et al., 2016)

**Tabela 1** - Percentagem de canibalismo em lagartas de terceiro ínstar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em diferentes quantidades de dieta artificial sob temperatura de 22, 25, 28, 31 ± 1 °C. Fotofase: 12h e UR: 70 ± 10%.

Alimento	Temperatura*			
	22°C	25°C	28°C	31°C
<b>0g</b>	42,50 Ca	70,00 Ba	75,00 Ba	86,25 Aa
<b>5g</b>	2,50 Bb	30,00 Ab	2,50 Bb	23,75 Ab
<b>10g</b>	1,25 Bb	11,25 Ac	1,25 Bb	18,75 Ab
<b>15g</b>	6,25 <sup>ns</sup> b	7,50 <sup>ns</sup> c	1,25 <sup>ns</sup> b	6,25 <sup>ns</sup> c
<b>20g</b>	3,75 <sup>ns</sup> b	2,50 <sup>ns</sup> c	0,00 <sup>ns</sup> b	2,50 <sup>ns</sup> c

\* Mesmas médias seguidas pela mesma letra maiúsculas na linha minúsculas na coluna não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. <sup>ns</sup> Não significativo, quanto ao desdobramento da temperatura dentro de cada nível da disponibilidade de alimento.

**Tabela 2** - Percentagem de canibalismo em lagartas de quarto ínstar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em diferentes quantidades de dieta artificial sob temperatura de 22, 25, 28, 31 ± 1 °C. Fotofase: 12h e UR: 70 ± 10%.

Alimento	Temperatura*			
	22°C	25°C	28°C	31°C
<b>0g</b>	70,00 Aa	38,75 Ba	33,75 Ba	65,00 Aa
<b>5g</b>	10,00 Bb	21,25 Aa	17,50 Aa	28,75 Ab
<b>10g</b>	3,75 Bb	18,75 Aa	1,25 Bb	17,50 Ab
<b>15g</b>	1,25 <sup>ns</sup> b	8,75 <sup>ns</sup> b	5,00 <sup>ns</sup> b	6,25 <sup>ns</sup> c
<b>20g</b>	0,00 <sup>ns</sup> b	5,00 <sup>ns</sup> b	1,25 <sup>ns</sup> b	3,75 <sup>ns</sup> c

\*Mesmas letras maiúsculas na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. <sup>ns</sup> Não significativo, quanto ao desdobramento da disponibilidade de alimento dentro de cada nível de temperatura. Dados transformados em arco seno  $\sqrt{(x/100)}$ .

**Tabela 3** - Percentagem de canibalismo em lagartas de quinto ínstar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em diferentes quantidades de dieta artificial sob temperatura de 22, 28, 31 ± 1 °C. Fotofase: 12h e UR: 70 ± 10%.

Alimento	Temperatura*		
	22°C	28°C	31°C
<b>0g</b>	41,50 Ca	58,75 Ba	72,50 Aa
<b>5g</b>	15,00 Bb	21,25 Ab	25,00 Ab
<b>10g</b>	1,25 <sup>ns</sup> c	2,50 <sup>ns</sup> c	6,25 <sup>ns</sup> c
<b>15g</b>	0,00 <sup>ns</sup> c	2,50 <sup>ns</sup> c	1,25 <sup>ns</sup> c
<b>20g</b>	0,00 <sup>ns</sup> c	2,50 <sup>ns</sup> c	1,25 <sup>ns</sup> c

\* Mesmas letras maiúsculas na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. <sup>ns</sup> Não significativo, quanto ao desdobramento da disponibilidade de alimento dentro de cada nível de temperatura. OBS: A temperatura de 25°C foi excluída pois apresentou presença de pré-pupa.

#### **4 CAPÍTULO III: DIETA PARA A INOCULAÇÃO *IN VIVO* DE *Spodoptera frugiperda* *multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) (LEFAVIRALES: BACULOVIRIDAE)**

##### **RESUMO**

O vírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) tem sido estudado e utilizado para o manejo de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), sendo esse o hospedeiro usado para a produção *in vivo* desse agente de controle biológico. A inoculação viral é realizada na dieta artificial usada para a multiplicação massal do hospedeiro. Neste trabalho propomos estudar dietas mais econômicas para a etapa de inoculação viral. Cada dieta constituiu-se como um tratamento, inoculando-se o vírus sob a mesma e avaliando diariamente a mortalidade. Posteriormente quantificou-se parâmetros de produção viral. Apesar das dietas avaliadas não apresentarem rendimento na produção semelhante à usada na multiplicação massal de *S. frugiperda*, a dieta D7 equiparou-se com a dieta D2 em relação ao custo com de dieta de inoculação viral para produzir uma dose por hectare. Além disso lagartas que apresentaram os maiores teores de proteína bruta apresentaram menor produção de poliedros virais.

**Palavras chave:** Controle microbiano. *Spodoptera frugiperda*. Lagarta-do-cartucho. Dieta artificial.

**DIETS FOR *IN VIVO* INOCULATION OF *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) (LEFAVIRALES: BACULOVIRIDAE)**

**ABSTRACT**

The *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) virus has been studied and used for the management of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*, this being the host used for the in vivo reproduction of this biological control agent. Viral inoculation is carried out in the artificial diet used for mass multiplication of the host. Each diet constituted a treatment, inoculating the virus under it and evaluating mortality daily. In this work we propose to study more economical diets for the viral inoculation stage. Each diet constituted a treatment, inoculating the virus under it and evaluating mortality daily. Subsequently, viral production parameters were quantified. Although the diets evaluated did not present yields similar to those used in the mass multiplication of *S. frugiperda*, the D7 diet was similar to the D2 diet in relation to the cost of the viral inoculation diet to produce one dose per hectare. In addition, caterpillars that had the highest crude protein contents showed lower production of viral polyhedra.

**Keywords:** Microbial Control. *Spodoptera frugiperda*. Fall armyworm. Artificial diet.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Os baculovírus são vírus de DNA que infectam artrópodes, muitos de importância agrícola e são utilizados em programa de manejo de pragas (LACEY et al., 2015; GRZYWACZ; MOORE, 2017; HUSSAIN et al., 2021). A coevolução entre os baculovírus e seus hospedeiros é refletida em uma faixa de espécies únicas ou intimamente relacionada, e essa especificidade possibilita o controle direcionado de uma determinada praga sem impacto negativo sobre os seres humanos, o meio ambiente e os insetos benéficos (COSTA et al., 2019; GARCÍA-BANDERAS et al. 2020; HUSSAIN et al., 2021; ZANELLA-SAENZ et al., 2022).

O vírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) tem sido estudado e utilizado como base para produção de inseticidas biológicos visando ao manejo da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (BARRERA et al., 2011; HUSSAIN et al., 2021; STINGUEL et al., 2022; VELASCO et al., 2022). A oferta comercial dos produtos biológicos requer uma produção eficiente e avanços na técnica para produção *in vitro*, no entanto a instabilidade de cepas de vírus em cultura de células, rendimento e custo de produção elevado devem ser considerados nesse cenário (CLAUS et al., 2012; REID et al., 2014; LACEY et al., 2015). Esses fatores, fazem com que o método de produção *in vivo* ainda seja empregado para a formulação dos bioinseticidas a base de SfMNPV até o momento, sendo necessário, portanto, a criação e produção de um grande número de indivíduos do hospedeiro (VALICENTE; TULHER; BARROS, 2010; GRZYWACZ; MOORE, 2017).

Além disso a produção de poliedros virais *in vivo* depende de uma série de variáveis, incluindo o canibalismo das larvas, temperatura, disponibilidade de alimento, ínstar larval, densidade e tempo de coleta dos indivíduos infectados (ELVIRA et al, 2010; ELVIRA, WILLIAMS, CABALLERO, 2010; VALICENTE et al., 2013; ZAMORA-AVILÉS et al., 2017; RAMÍREZ-ARIAS et al., 2019; RIOS-VELASCO et al., 2012; STINGUEL et al., 2022; VELASCO et al., 2022). Isso permite muitas possibilidades de pesquisa e melhoria do processo produtivo, como por exemplo, o estudo do alimento usado na etapa de inoculação *in vivo* do entomopatógeno, uma vez que a ingestão do vírus presente no alimento é a principal forma pela qual ocorre a contaminação. Atualmente o principal alimento usado na inoculação viral é a dieta

artificial empregada na multiplicação massal do hospedeiro, com exceção o formaldeído pois inativa o vírus (MACHADO et al., 2021; STINGUEL et al., 2022).

Para a multiplicação massal do inseto hospedeiro em laboratório é importante uma dieta isenta de contaminação e nutricionalmente equilibrada, mas para a etapa de infecção viral do lote de hospedeiros para a produção de vírus, em que o inseto não completará o ciclo e terá a alimentação reduzida, há um desperdício de dieta artificial, pois após a infecção viral a lagarta permanece alimentando-se normalmente por mais alguns dias, e aos poucos essa alimentação é reduzida devido o processo de infecção viral (SILVA; PARRA, 2013; PINTO et al., 2019; TRUZI et al., 2021).

Dessa forma, estudar dietas para selecionar as mais economicamente viáveis em relação aos custos de produção, e que além disso proporcione uma boa produção de poliedros virais, possa ser opção para substituir a dieta artificial usada para criação do hospedeiro na etapa de inoculação do vírus (TRUZI et al., 2021). E conseqüentemente a redução no custo de produção beneficia a competitividade do produto biológico no mercado (GRZYWACZ; MOORE, 2017). Na literatura há relatos de dieta artificial para a multiplicação massal do hospedeiro (SILVA; PARRA, 2013; PINTO et al., 2019; TRUZI et al., 2021), contudo existe carência de publicações disponíveis em relação ao estudo de uma dieta para inoculação viral de SfMNPV mais econômica e que mantenha boa produção de poliedros virais. O objetivo dessa pesquisa foi estudar dietas artificiais para a etapa da inoculação viral *in vivo* de SfMNPV.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Controle Microbiano de Insetos, Setor de Entomologia do NUDEMAFI (Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças) localizado no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE/UFES), em Alegre, Espírito Santo, Brasil.

### 4.2.1 Multiplicação massal e manutenção de *Spodoptera frugiperda*

A multiplicação e manutenção foram realizadas em sala climatizada Tipo BOD a temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de 60% e fotofase de 12 horas. Os



adultos foram mantidos em gaiola de PVC alimentados por meio de algodão embebido em solução de sacarose a 10%. Para a oviposição, foram utilizadas folhas de papel branco recobrando o interior das gaiolas, sendo retiradas a cada dois dias para a remoção das posturas. As posturas foram mantidas em potes plásticos transparentes até a eclosão dos neonatos. Estes foram transferidos com o auxílio de um pincel de cerdas macias para recipientes plásticos (100 mL) contendo dieta artificial adaptada à base de feijão, germe de trigo, levedura de cerveja e caragenina descrita por Nalim (1991), permanecendo por cinco dias. Posteriormente foram transferidas aproximadamente 40 lagartas para recipiente de acrílico tipo gerbox<sup>®</sup> (dimensões de 11 x 11 x 3 cm) e após 10 dias foram individualizadas em gerbox<sup>®</sup> (3 cm diâmetro) até a formação de pupa. Com a emergência dos adultos, os mesmos foram transferidos para as gaiolas de criação, dando continuidade ao ciclo.

#### **4.2.2 Obtenção e produção de SfMNPV**

Para o ensaio foi utilizado o isolado 6 do vírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV), proveniente do Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo, por não ocasionar a liquefação do tegumento imediatamente após a morte do inseto e minimizar as perdas de poliedros virais (VIEIRA et al., 2012).

A multiplicação do vírus foi feita a partir de uma suspensão inicial na concentração de  $1 \times 10^8$  OB/mL, em que pedaços de dieta artificial (sem adição de formaldeído) foram imersas e oferecidas para as lagartas de *S. frugiperda* alimentarem-se. Os insetos foram mantidos individualizados em recipientes plásticos (50 mL), repondo a dieta artificial sempre que necessário. Após a infecção e morte os cadáveres foram recolhidos e congelados para posteriormente serem macerados e purificados.

A purificação seguiu a metodologia proposta por Hashimoto et al. (2000) com modificações, as lagartas infectadas foram maceradas em água destilada autoclavada contendo SDS a 1% (Dodecil Sulfato de Sódio) e filtrada em tecido *voile* com intuito de facilitar a remoção do tecido gorduroso da lagarta e separar o líquido resultante das partes mais grosseiras da lagarta. Posteriormente, procedeu-se com a centrifugação a 6000 rpm/20 minutos, repedindo-se esse procedimento por três vezes. Após a última centrifugação o precipitado obtido foi ressuspenso em água destilada

esterilizada e armazenado a 4 °C para serem posteriormente empregadas no experimento.

#### 4.2.3 Seleção de dieta de inoculação de SfMNPV

A dieta artificial rotineiramente usada para a multiplicação massal de *S. frugiperda* denominada D1. A dieta D1 sem adição de formaldeído denominada D2 foram comparadas às dietas propostas nesse trabalho para a inoculação viral (Tabela 1). A comparação foi realizada em três etapas: na primeira etapa foram avaliadas as dietas D3 a D7; segunda etapa foram avaliadas as dietas D8 a D13 e na terceira etapa D7 (selecionada na primeira etapa), D11 (selecionada na segunda etapa), D14 e D15 (Tabela 1, 2 e 3, respectivamente).

Após o preparo das dietas uma alíquota de 10 mL das foi vertida em copinhos plásticos (50 mL), constituindo as unidades experimentais. O tratamento D1 foi a testemunha e nos demais tratamentos, sob a superfície da dieta, foi pipetado uma alíquota de 100 µl da suspensão viral de SfMNPV (Isolado 6) na concentração de  $1 \times 10^8$  OB/mL. A concentração foi determinada por contagem dos OBs em câmara de Neubauer com microscópio óptico e aumento de 400 vezes.

Em cada unidade amostral foi inoculada uma lagarta de *S. frugiperda*. O ensaio foi realizado separadamente com lagartas 8 dias de idade desenvolvidas na temperatura de  $25 \pm 1$  °C, posteriormente permaneceram em sala climatizada à  $25 \pm 1$  °C. Cada tratamento foi constituído por 8 repetições contendo 12 insetos/repetição em um delineamento inteiramente casualizado.

Os seguintes parâmetros foram avaliados: Percentagem de mortalidade de lagartas; Massa das lagartas mortas (g) /repetição; Total de corpos de oclusão (OB total): número de poliedros quantificados em câmara de Neubauer x volume da amostra (10 mL); Corpos de oclusão por lagarta (OB/lagarta): OB total/pelo número de lagartas coletadas de cada repetição; Lagarta equivalente por hectare (LE/ha):  $3 \times 10^{11}$ /OB/lagarta de cada repetição (OBS: LE/ha baseia-se no número estimado de lagartas necessárias para se obter  $3 \times 10^{11}$  OB que refere-se a dose do bioinseticida para pulverizar em um hectare para controle efetivo da praga (MAPA, 2015)); Corpos de oclusão por grama (OB/g): OB total/peso das lagartas coletadas de cada repetição; Corpos de oclusão pelo número de lagartas mortas a cada 100 lagartas inoculadas (OB/100 Lagartas): percentagem de mortalidade\*OB/lagarta.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

#### **4.2.4 Determinação do teor de proteína bruta das lagartas alimentadas com dieta de inoculação**

Para realizar a determinação do teor de proteína bruta das lagartas alimentadas com as diferentes dietas de inoculação, foram usadas lagartas de *S. frugiperda* de 8 dias de idade, e alimentadas durante 7 dias com as dietas D2, D7, D11, D14 e D15. Após esse período as lagartas foram mantidas congeladas até secagem em estufa à 40 °C por 72 horas e peso constante. As amostras secas foram maceradas e analisadas em triplicata, pesando-se entre 0,3 g e 0,5 g cada em papel guardanapo. Em seguida foram postas em tubo de digestão, acrescidas de 2 g da mistura catalizadora (sulfato de cobre e sulfato de potássio 1:10) e 8mL de ácido sulfúrico PA. Os tubos foram levados para digestão em placa aquecedora até viragem da cor para azul piscina. A fim de evitar perda de amostra, a temperatura da chapa foi aumentada gradualmente de 50 °C em 50 °C a cada meia hora, até atingir 350 °C e haver a completa decomposição da matéria orgânica da amostra perceptível visualmente pela mudança da cor da amostra, de preto para azul piscina.

Findado este processo, os tubos foram retirados do bloco digestor e depois de frios acrescentou-se neles entorno de 10 mL de água destilada. Em seguida os tubos foram levados para destilação em aparelho Destilador de Nitrogênio Kjeldahl. A solução no tubo foi neutralizada com NaOH 50% até viragem da cor para preta. Observa-se também neste momento a formação de um precipitado. Este processo de acréscimo de NaOH ao tubo de digestão deve ser realizado de forma extremamente lenta, pois se trata de uma reação exotérmica, com geração intensa de calor.

Paralelamente foi acrescido em um frasco Erlenmeyer uma solução aceptora de 50 mL de ácido bórico a 4% contendo indicador misto (vermelho de metila e verde de bromocresol). No Erlenmeyer foi recolhido a amônia carregada por vapor presente na amostra, formando borato de amônio. O final da reação é percebido pela mudança da cor da solução de rosa para verde.

Em seguida, a solução de borato de amônio foi titulada com HCl 0,1 M até a viragem da cor, de verde para rosa. Juntamente com as demais amostras e submetido aos mesmos processos, preparou-se um tubo “branco” com todos os reagentes,

exceto amostra, com o objetivo de eliminar a interferência e contaminação dos reagentes.

Com o registro da massa das amostras e volume de HCl gastos na titulação foram realizados os cálculos para obtenção do teor de proteína bruta (PB) presente nas amostras:

$$PB \% = [(V' - V) \times F_c \times M \times 6,25 \times 0,014]/P] \times 100$$

PB%= percentagem de Proteína Bruta teor de nitrogênio total na amostra;

V'= volume da solução de HCl gasto na titulação da amostra;

V= volume da solução de HClgasto na titulação do branco;

F<sub>c</sub>= fator de correção do HCl 0,1 M;

M= Molaridade;

P= massa da amostra (em gramas).

6,25 = fator de conversão do nitrogênio em proteína; e

0,014 = miliequivalente-grama do nitrogênio

### 4.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Dieta de inoculação de SfMNPV e idade larval de *S. frugiperda*

Os resultados obtidos por meio do bioensaio de seleção de dietas para inoculação viral das lagartas de *S. frugiperda* com 8 dias de idade desenvolvidas à 25 °C encontra-se apresentado nas tabelas 4, 5 e 6. Dentre as dietas artificiais propostas para a inoculação viral na primeira etapa de seleção (D3, D4, D5, D6 e D7) nenhuma igualou-se a dieta artificial rotineiramente usada para a multiplicação massal de *S. frugiperda* (D2) para os parâmetros avaliados (Tabela 4). Em seguida podemos destacar as dietas D4, a base de fubá e levedura de cerveja e a dieta D7, a base de gérmen de trigo, para a produção de poliedros virais (Tabela 4).

Os resultados apresentados demonstram que a dieta de inoculação do tratamento D7 com lagartas inoculadas à 25 °C com 8 dias de idade apresentou produtividade em torno de  $1,059 \times 10^{11}$  OB/mL para o parâmetro OB/100 lag e a dieta padrão (D2) em torno de  $1,479 \times 10^{11}$  OB/mL (Tabela 4). Apesar da diferença estatística apresentada para esse resultado entre as dietas D2 e D7, podemos ressaltar que os custos para a produção da dieta D7 é menor que a dieta artificial

rotineiramente usada para a multiplicação massal D2 (Tabela 1). E, mesmo que a lagarta equivalente (LE) produzidas sejam de 113 e 234 lagartas (Tabela 4) ou 218 e 399 lagartas (Tabela 6), respectivamente para as dietas D2 e D7, os custos com o gasto de dieta para inocular tais quantidades de lagartas com vírus se equiparam, e nesse caso, pode-se pensar em uma possibilidade de aplicação da dieta D7 para inoculação viral.

A dieta de inoculação D3, apenas a base de fubá como fonte energética, foi a que apresentou os menores valores de produção de poliedros virais (Tabela 4). Em relação as dietas artificiais propostas para a inoculação viral na segunda etapa de seleção apresentadas na tabela 6 (D8, D9, D10, D11, D12 e D13), nenhuma igualou-se a dieta artificial de multiplicação rotineiramente usada para a multiplicação massal de *S. frugiperda* (D2) para os parâmetros avaliados. Contudo podemos ressaltar que a dieta D11, a base de leite em pó e solução vitamínica, foi a que apresentou uma produção de poliedros virais estatisticamente mais próximas à dieta de multiplicação (Tabela 5). O tratamento D11 produziu em torno de  $2,505 \times 10^9$  OB/mL para o parâmetro OB/100 lag e a dieta padrão (D2) em torno de  $1,116 \times 10^{11}$  OB/mL (Tabela 5).

As dietas de inoculação D8, D9 e D12 a base de caseína e albumina foram as que apresentaram os menores valores de produção de poliedros virais, variando entre 4,07 a  $4,55 \times 10^8$  OB/mL (Tabela 5).

O terceiro agrupamento de seleção de dieta para inoculação, foi constituído pelas dietas que se destacaram na primeira e segunda etapa de seleção, D7 e D11, respectivamente, bem como a dieta D14 contendo 4 g de ácido sórbico e os demais ingredientes, com exceção para formaldeído, nipagin e tetraciclina; e o tratamento D15, que contem metade dos ingredientes de D14 (Tabela 6). Nessa última etapa de seleção verificou-se que a dieta D15 igualou-se a dieta artificial D2 rotineiramente usada para a multiplicação massal de *S. frugiperda*. Em seguida destacou-se a dieta D7, porém a dieta D15 apresentou uma maior contaminação em relação à dieta D7, sendo então descartada para as etapas posteriores. A pior produção viral foi com a inoculação feita na dieta D11 (Tabela 6).

A dieta artificial D1 tem sido usada com êxito para a multiplicação massal de *S. frugiperda* em laboratório (SILVA; PARRA, 2013; PINTO et al., 2019; MACHADO et al., 2021; STINGUEL et al., 2022). E a dieta artificial D2 (sem formaldeído) para a inoculação viral de SfMNPV sobre a superfície da dieta (MACHADO et al., 2021;

STINGUEL et al., 2022). As dietas D1 e D2 são idênticas na composição, com exceção para o formaldeído, pois o mesmo promove a inativação dos poliedros virais. Algo observado durante o período de inoculação viral é a redução da alimentação das lagartas infectadas. Conseqüentemente há sobra desse substrato alimentar que é inutilizado, sendo interessante utilizar uma dieta mais simples na composição e de menor custo financeiro para essa etapa do processo de produção massal do vírus.

Com esse intuito, as dietas avaliadas neste estudo apontaram um resultado interessante para a replicação viral. Houve diferença estatística entre as dietas D2 e D7, com a produtividade em torno de  $1,479 \times 10^{11}$  OB/mL e  $1,059 \times 10^{11}$  OB/mL para o parâmetro OB/100 lag, respectivamente, mas a dieta D7 apresentou um custo financeiro de aproximadamente 35% menor do que a dieta D2. A redução da quantidade de ingredientes utilizados é interessante, pois reduz o custo de preparo da dieta (TRUZI et al., 2021). Em alguns casos, a substituição de um único ingrediente pode reduzir em até 60% os custos da dieta (ALFAZAIKY et al., 2012; TRUZI et al., 2021). Outra vantagem observada na dieta D7 é a pouca contaminação por microorganismos, detalhe importante durante o processo de inoculação viral (SUBRAMANIAN et al., 2006).

A substituição por ingredientes que reduzam o custo da dieta e mantenham a produção de OBs é uma pesquisa desenvolvida também para outros patossistemas, como o caso da *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) e o vírus *Spodoptera littoralis nucleopolyhedrosis virus* (SpliNPV) (ALFAZAIKY et al., 2012; SAYED et al., 2021). Esses autores encontraram redução dos custos por quilograma de dieta com a substituição do ágar da dieta por ingrediente menos dispendioso.

Contudo essa substituição dos ingredientes, por exemplo por amido ou gelatina, não possibilitou a formação da fase de pupa (ALFAZAIKY et al., 2012; SAYED et al., 2021). No entanto, observaram uma alta mortalidade dos insetos ao vírus SpliNPV quando alimentados em dieta à base de gelatina e amido em relação às alimentadas com dieta à base de ágar. Segundo os autores os gelificantes podem interferir na patogenicidade viral, principalmente em concentrações virais mais baixas. Elvira et al. (2010) supõem que na liberação de moléculas de água associadas ao gelificante haveria liberação de íons ou algum material solúvel em água que poderiam ser prejudiciais à atividade de OB.

Isso ressalta a importância do presente estudo, pois modificações na composição da dieta para inocular o vírus pode interferir também na produção viral.

Assim a proposta de substituir e/ou remover um determinado ingrediente no preparo da dieta para a inoculação viral além de reduzir os custos é importante que mantenha as características adequadas para uma boa produção de poliedros virais.

Lagartas de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) também apresentaram diferentes respostas de susceptibilidade ao vírus *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) de acordo com a dieta que foram alimentadas durante o período de inoculação viral (CHEN et al., 2018). A dose letal (DL<sub>50</sub>) encontrada foi de 3,1 OBs, 16,6 OBs e 61,6 OBs para lagartas criadas em dieta artificial, folhas de repolho e folhas de batata, respectivamente (CHEN et al., 2018). Os autores descrevem mudanças na estrutura da membrana peritrófica das lagartas alimentadas com diferentes dietas e conseqüentemente a suscetibilidade à patógenos (CHEN et al., 2018). Além da estrutura física, outros efeitos que a dieta alimentar pode influenciar é na defesa humoral e celular e/ou supressão do sistema imunológico por produtos químicos de defesa da planta ingerida (SHIKANO et al., 2010).

A dieta artificial manteve as características estruturais da membrana peritrófica mais finas e frágeis, apresentando pouca barreira à infecção viral. Ao contrário do observado quando as lagartas se alimentaram de folhas de repolho e de batata, apresentando camadas mais espessas e microvilosidades, intervindo no processo de infecção viral (CHEN et al., 2018). Podemos analisar no presente estudo que todos os tratamentos correspondem às dietas artificiais e que as mudanças na estrutura física da membrana peritrófica possivelmente não tenha sido a causa para a diferença de susceptibilidade a SfMNPV, e conseqüentemente da produção de OBs.

A principal diferença entre os tratamentos está na composição nutricional das dietas, percebe-se por exemplo, que apesar de D15 e D14 terem 4g de ácido sórbico em sua constituição, a quantidade de ácido ascórbico para dieta D14 foi o dobro da dieta D15. O ácido ascórbico pode influenciar no pH intestinal deixando levemente mais ácido, como observado por Chen et al. (2018) quando lagartas de *T. ni* alimentaram-se com folhas de repolho. Isso pode explicar a diferença de  $1,12 \times 10^{11}$  OB/100 lag na dieta D15 e de apenas  $1,42 \times 10^{10}$  OB/100 lag na dieta D14, mesmo sendo mais rica nutricionalmente. Em geral, o pH no intestino médio de lepidópteros varia de 9-11, e acima de 8 é suficientemente alcalino para desintegrar os poliedros virais (CHEN et al., 2018), desta forma mudanças que provocam a redução do pH do intestino médio podem interferir na infectividade viral e na produção de OBs.

#### 4.3.2 Determinação do teor de proteína bruta das lagartas alimentadas com dieta de inoculação

A determinação do teor de proteína bruta das lagartas alimentadas com as diferentes dietas de inoculação encontra-se apresentado a tabela 6. A dieta D11 diferiu-se das demais, apresentando a maior percentagem do teor de proteína bruta, 42,25%. As demais fontes de inoculação assemelharam-se entre si variando os teores de proteína bruta entre 19,56 a 28,54% (Tabela 6).

Como a principal constituição dos poliedros virais é de uma membrana lipoprotéica, logo associa-se a hipótese de que dietas mais ricas em proteína seriam a base para uma boa produção viral (LACEY et al., 2015; GRZYWACZ; MOORE, 2017; HUSSAIN et al., 2021). No entanto, a partir dos resultados observados na Tabela 6, percebe-se que as maiores percentagens proteína bruta na constituição da lagarta resultou em menores produção de OBs.

Isso pode ser explicado por meio da dinâmica de automedicação com macronutrientes (POVEY et al., 2013). Essa dinâmica consiste em uma mudança no comportamento alimentar quando os invertebrados estão infectados, buscando substâncias que melhorem sua capacidade de superar a infecção. Estudos recentes demonstram que os macronutrientes podem influenciar a resposta imune e que os indivíduos desafiados por patógenos podem se automedicar optando por dieta mais rica em proteína e pobre em carboidrato (POVEY et al., 2013). A concentração de proteína também foi positivamente associada à resistência de *T. ni* ao nucleopolyhedrovirus (SNPV) (SHIKANO et al., 2010).

Isso pode explicar o motivo do tratamento D11 produzir menor quantidade de OBs (Tabela 6). Percebe-se que as lagartas alimentadas nessa dieta apresentaram maiores níveis proteicos em sua constituição, e, certamente a hipótese da automedicação pode ter sido a resposta para essa baixa produtividade de OBs. E ainda, os recursos proteicos disponíveis para a atividade de divisão celular podem ter aumentado a capacidade de os insetos eliminarem as células infectadas do intestino médio mais rapidamente (SHIKANO et al., 2010).

Além disso, durante o ciclo infeccioso de SfMNPV as células internas do corpo, especialmente as células do corpo adiposo, são o local onde grandes quantidades de vírus derivado de oclusão (ODVs) são produzidas e ficam oclusas em OBs (REID et al., 2022), e podemos inferir, em geral, que as células de tecido adiposo requerem



carboidratos para serem produzidas. Logo, o resultado obtido nesse ensaio é importante, pois direciona as futuras investigações de pesquisa para dietas que sejam mais ricas em carboidratos, por exemplo, para obter sucesso na produção viral.

#### 4.4 CONCLUSÃO

As dietas avaliadas não apresentaram rendimento na produção viral quando comparada a dieta atualmente empregada para multiplicação massal de *S. frugiperda*. A dieta D7 equipara-se com a dieta D2 em relação ao custo com de dieta de inoculação viral para produzir uma dose por hectare.

As lagartas de *S. frugiperda* que apresentaram os maiores teores de proteína bruta apresentaram menor produção de poliedros virais.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

ALFAZAIRY, A.A.; SADEK, H.A.; GUIRGUIS, G.Z.; KARAM, H.H. An agar-free insect rearing artificial diet: A new approach for the low cost mass rearing of the egyptian cotton Leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Life Science Journal**, v.9, n.4, p. 1-8, 2012.

BARRERA, G.; SIMÓN, O.; VILLAMIZAR, L.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. **Biological Control**, v. 58, n.2, p. 113-120, 2011.

CHEN, E.; KOLOSOV, D.; O'DONNELL, M.J.; ERLANDSON, M.A.; MCNEIL, J.N.; DONLY, C. The effect of diet on midgut and resulting changes in Infectiousness of AcMNPV Baculovirus in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Frontiers in Physiology**, v.9, p. 1-11, 2018.

CLAUS, J.D.; GIORIA, V.V.; MICHELOUD, G.A.; VISNOVSKY, G. Production of Insecticidal Baculoviruses in Insect Cell Cultures: Potential and Limitations. In: SOLONESKI, S. **Insecticides – Basic and Other Applications**. In Tech, 2012. p. 127-152.

COSTA, V.H.D.; SOARES, M.A.; DIMATE, F.A.R.; SÁ, V.G.M.; ZANUNCIO, J.C.; VALICENTE, F.H. Genetic identification and biological characterization of baculovirus isolated from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Florida Entomologist**, v.102, n.1, p.59-64, 2019.

ELVIRA, S.; GORRÍA, N.; MUÑOZ, D.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. A. Simplified Low-Cost Diet for Rearing *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and Its Effect

on *S. exigua* Nucleopolyhedrovirus Production. **Biological and microbial control**, v.103, n.1, p.17-24, 2010.

ELVIRA, S.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. Juvenile hormone analog technology: effects on larval cannibalism and the production of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. **Journal of economic entomology**, v.103, n.3, p. 577-582, 2010.

GARCÍA-BANDERAS, D.; TAMAYO-MEJÍA, F.; PINEDA, S.; ROSA, J.I.F.; LASA R.; CHAVARRIETA-YÁÑEZ, J.M.; GERVASIO-ROSAS, E.; ZAMORA-ÁVILÉS, M.S.I.; RAMOS-ORTIZ, S.; VALLE, J.; MARTÍNEZ-CASTILLO, A.M. Biological characterization of two *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus isolates from Mexico and evaluation of one isolate in a small-scale field trial. **Biological Control**, v.149, p. 1-8, 2020.

GRZYWACZ, D., MOORE, S., 2017. Production, formulation, and bioassay of baculoviruses for pest control. In: Lacey, L.A. (Ed.), **Microbial Control of Insect and Mite Pests. From Theory to Practice**. Academic Press, San Diego, CA, p. 109–124.

HASHIMOTO, Y.; HAYASHI, K.; HAYAKAWA, T.; UENO, Y.; SHIMOJO, E.I.; KONDO, A.; MIYASONO, M.; SANO, Y.; MATSUMOTO, T.; GRANADOS, R.R. Physical map of a *Plutella xylostella* granulovirus genome. **Applied Entomology and Zoology**, v.35, n.1, p.45-51, 2000.

HUSSAIN, A.G.; WENNMANN, J.T.; GOERGEN, G.; BRYON, A.; ROS, V.I.D. Viruses of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*: A Review with Prospects for Biological Control. **Viruses**, v. 13, p. 1-21, 2021.

LACEY, L.A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D.I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M.S. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of invertebrate pathology**, v.132, p.1-41, 2015.

MACHADO, L. C.; SANTOS JUNIOR, H. G. dos; SANTOS, B. A. dos; SOARES, C. O.; MAURI, L. V. R.; RODRIGUES, J. A. Desenvolvimento de estágio larval de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) em temperaturas sob condição padronizada. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 14, n. 3, 2021.

NALIM, D. M. Biologia, nutrição quantitativa e controle de qualidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais. 1991. 150f. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1991.

PINTO, J. R. L.; TORRES, A. F.; TRUZI, C. C.; N. F.; VIEIRA A. M.; VACARI; BORTOLI, S. A. DE. Artificial corn-based diet for rearing *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Science**, v.19, n.4, p. 1-8, 2019.

POVEY, S.; COTTER, S.C.; SIMPSON, S.J.; LEE, K.P.; WILSON, K. Can the protein costs of bacterial resistance be offset by altered feeding behaviour? **Journal of Animal Ecology**, v.78, n.2, p.437-446, 2009.

RAMÍREZ-ARIAS, F.G.; LASA, R.; MURILLO, R.; NAVARRO-DE-LA-FUENTE, L.; GABRIEL MERCADO, G.; WILLIAMS, T. Post-mortem incubation influences occlusion body production in nucleopolyhedrovirus-infected larvae of *Spodoptera frugiperda*. **Biological Control**, v.135, p. 33-40, 2019.

REID, S., CHAN, L., VAN OERS, M.M. Production of entomopathogenic viruses. In: MORALES-RAMOS, J.A., ROJAS, M.G., SHAPIRO-ILAN, D.I. (Eds.), *Mass Production of Beneficial Organisms*. Elsevier, Amsterdam, 2014. p. 437–482.

REID, S.; MALMANCHE, H.; CHAN, L.; POPHOM, H.; VAN OERS, M.M. Production of entomopathogenic viruses. In: Morales-Ramos, J.A.; Rojas, M.G.; Shapiro-Ilan, D. I. (Eds) *Mass production of beneficial organisms: invertebrates and entomopathogens*. London: Academic Press is an imprint of Elsevier, 2022. p. 375-397.

RIOS-VELASCO, C.; GALLEGOS-MORALES, G.; BERLANGA-REYES, D.; CAMBERO-CAMPOS, J.; ROMO-CHACÓN, A. Mortality and production of occlusion bodies in *Spodoptera frugiperda* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) treated with nucleopolyhedrovirus. **Florida Entomologist**, v.95, n.3, p. 752-757, 2012.

SAYED, W. A. A.; EL-HELALY, A.; JAMAL, Z. A.; EL-BENDARY, H. Effect of a low cost diet on the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrosis virus pathogenicity and sterile insect technique. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v.31, n.117, p. 1-8, 2021.

SHIKANO, I.; ERICSSON, J.D.; CORY, J.S.; MYERS, J.H. Indirect plant-mediated effects on insect immunity and disease resistance in a tritrophic system. **Basic and Applied Ecology**, n.11, p.15-22, 2010.

SILVA, C.S.B. da; PARRA, J.R.P. New method for rearing *Spodoptera frugiperda* in laboratory shows that larval cannibalism is not obligatory. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.57, n.3, p. 347-349, 2013.

STINGUEL, P.; PAIVA, C.E.C.; ZUIM, V.; AZEVEDO, A.C.T.; VALICENTE, F.H.; DOS SANTOS JÚNIOR, H.J.G. Optimization of In Vivo Production of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV). **Neotropical Entomology**, v.51, n.1, p.122-132, 2022.

SUBRAMANIAN, S.; SANTHARAM, G.; SATHIAH, N.; KENNEDY, J.S.; RABINDRA, R.J. Influence of incubation temperature on productivity and quality of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. **Biological Control**, v.37, n.3, p. 367-374, 2006.

TRUZI, C.C.; VIEIRA, N.F.; DE SOUZA, J.M.; DE BORTOLI, S.A. (2021). Artificial diets with different protein levels for rearing *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Science**, v.21, n.4, p. 1-7, 2021.

VALICENTE, F.H.; TUELHER, E.S.; PENA, R.C.; ANDREAZZA, R.; GUIMARÃES, M.R.F. Cannibalism and virus production in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae fed with two leaf substrates inoculated with *Baculovirus spodoptera*. **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 2, p. 191-199, 2013.

VALICENTE, F.H.; TULHER, E.S.; BARROS, E.C. **Processo de produção comercial de baculovírus em grande escala**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2010b. 6p. (Circular Técnica, 157).

VELASCO, E. A.; MOLINA-RUÍZ, C. S.; GÓMEZ-DÍAZ, J. S.; WILLIAMS, T. Properties of nucleopolyhedrovirus occlusion bodies from living and virus-killed larvae of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v.174, p. 1-8, 2022.

ZAMORA-AVILÉS, N.; MARTÍNEZ, A.M.; PINEDA, S.; BRAVO-PATIÑO, A.; FIGUEROA, I.; LASA, R. Cool-textured diets for use in baculovirus production. **Biocontrol Science and Technology**, v.27, n.11, p. 1327-1338, 2017.

ZANELLA-SAENZ I.; HERNIOU E.A.; IBARRA J.E.; HUERTA-ARREDONDO I.A.; DEL RINCÓN-CASTRO M.C. Virulence and genetic characterization of six baculovirus strains isolated from different populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Archives of Microbiology**, v. 204, n.1, p. 1-11, 2022.

**Tabela 1-** Componentes da dieta artificial de multiplicação de *Spodoptera frugiperda* (D1 e D2) e das dietas propostas para inoculação viral de SfMNPV (D3, D4, D5, D6 e D7) da primeira etapa.

Ingredientes	Dieta artificial		Dieta para inoculação viral				
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
	(g/litro)		(g/litro)				
Água (mL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Feijão (g)	138	138	-	-	-	-	-
Gérmen de Trigo (g)	66,28	66,28	-	-	-	-	66,28
Levedura de Cerveja (g)	42,26	42,26	-	42,26	-	-	-
Ácido ascórbico (g)	4,27	4,27	4,27	4,27	4,27	4,27	4,27
Ácido sórbico (g)	1,38	1,38	-	-	-	-	-
Nipagin (g)	2,64	2,64	2,64	2,64	2,64	2,64	2,64
Formaldeído (mL)	10,46	-	-	-	-	-	-
Tetraciclina (g)	0,209	0,209	-	-	-	-	-
Carragenina (g)	13,63	13,63	30	30	30	30	30
Fubá (g)	-	-	30	30	-	-	-
Proteína de soja (g)	-	-	-	-	32,5	-	-
Farelo de soja (g)	-	-	-	-	-	21,43	-
<b>Custo dieta (R\$/L)</b>	<b>13,91</b>	<b>13,61</b>	<b>7,49</b>	<b>9,45</b>	<b>8,09</b>	<b>7,76</b>	<b>8,98</b>

**Tabela 2** - Componentes da dieta artificial de multiplicação de *Spodoptera frugiperda* (D1 e D2) e das dietas propostas para inoculação viral de SfMNPV (D8, D9, D10, D11, D12 e 13) da segunda etapa.

Ingredientes	Dieta artificial		Dieta para inoculação viral					
	D1	D2	D8	D9	D10	D11	D12	D13
	(g/litro)		(g/litro)					
Água (mL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Feijão (g)	138	138	-	-	-	-	-	-
Gérmen de Trigo (g)	66,28	66,28	-	-	-	-	-	-
Levedura de Cerveja (g)	42,26	42,26	-	-	-	-	-	-
Ácido ascórbico (g)	4,27	4,27	-	-	-	-	-	-
Ácido sórbico (g)	1,38	1,38	-	-	-	-	-	-
Nipagin (g)	2,64	2,64	2,64	2,64	2,64	2,64	2,64	2,64
Formaldeído (mL)	10,46	-	-	-	-	-	-	-
Tetraciclina (g)	0,209	0,209	-	-	-	-	-	-
Carragenina (g)	13,63	13,63	25	25	25	25	25	25
Caseína (g)	-	-	30	30	-	-	-	-
Leite em pó (g)	-	-	-	-	30	30	-	-
Albumina (g)	-	-	-	-	-	-	30	30
Solução Vitamínica (mL)	-	-	-	9	-	9	-	9
<b>Custo dieta (R\$/L)</b>	<b>13,91</b>	<b>13,61</b>	<b>35,91</b>	<b>36,04</b>	<b>7,27</b>	<b>7,41</b>	<b>9,07</b>	<b>9,21</b>

**Tabela 3** - Componentes da dieta artificial de multiplicação de *Spodoptera frugiperda* (D1 e D2) e das dietas propostas para inoculação viral de SfMNPV (D7, D11, D14 e D15) da terceira etapa.

Ingredientes	Dieta artificial		Dieta para inoculação viral			
	D1	D2	D7	D11	D14	D15
	(g/litro)			(g/litro)		
Água (mL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Feijão (g)	138	138	-	-	138	69,04
Gérmen de Trigo (g)	66,28	66,28	66,28	-	66,28	33,14
Levedura de Cerveja (g)	42,26	42,26	-	-	42,26	21,13
Ácido ascórbico (g)	4,27	4,27	4,27	-	4,27	2,13
Ácido sórbico (g)	1,38	1,38	-	-	4,00	4,00
Nipagin (g)	2,64	2,64	2,64	2,64	-	-
Formaldeído (mL)	10,46	-	-	-	-	-
Tetraciclina (g)	0,209	0,209	-	-	-	-
Carragenina (g)	13,63	13,63	30	25	15	15
Leite em pó (g)	-	-	-	30	-	-
Solução Vitamínica (mL)			-	9	-	-
<b>Custo dieta (R\$/L)</b>	13,91	13,61	8,98	7,41	10,34	7,71

**Tabela 4** - Parâmetros de produção de poliedros virais em dietas alternativas da primeira etapa para inoculação de SfMNPV em lagartas de 8 dias de *S. frugiperda* desenvolvidas na temperatura de  $25 \pm 1$  °C. Fotofase: 12h e UR:  $70 \pm 10\%$ .

Parâmetros de produção de poliedros virais <sup>1</sup>					
Dietas	LE*	OB/total (x 10 <sup>8</sup> ) <sup>1</sup>	OB/lag (x 10 <sup>6</sup> )	OB/100 lag (x10 <sup>8</sup> )	OB/g (x10 <sup>8</sup> )
<b>D2</b>	113,34 ± 11,30 a	177,50 ± 16,97 a	2944,78 ± 449,81 a	1479,17 ± 141,43 a	70,2 ± 5,59 a
<b>D3</b>	44883,74 ± 9306,38 d	1,17 ± 0,30 d	9,83 ± 2,46 d	9,74 ± 2,47 d	2,64 ± 0,56 d
<b>D4</b>	298,01 ± 16,97 b	113,75 ± 5,25 b	1030,41 ± 60,13 b	947,92 ± 43,76 b	59,93 ± 2,77 b
<b>D5</b>	823,13 ± 95,38c	38,28 ± 6,18 c	402,27 ± 48,63 c	320,69 ± 50,71 c	23,87 ± 3,36 c
<b>D6</b>	922,28 ± 102,25 c	40,97 ± 4,51 c	354,15 ± 39,08 c	345,50 ± 38,10 c	28,61 ± 3,12 c
<b>D7</b>	234,98 ± 32,10 b	122,03 ± 20,80 b	1445,70 ± 184,07 b	1059,32 ± 181,11 b	51,31 ± 3,16 b

<sup>1</sup>Médias seguidas por uma mesma letra na coluna não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

\*LE: dados transformados log (x) e os demais parâmetros raiz (x);



**Tabela 5** - Parâmetros de produção de poliedros virais em dietas alternativas da segunda etapa para inoculação de SfMNPV em lagartas de 8 dias de *S. frugiperda* desenvolvidas na temperatura de  $25 \pm 1$  °C. Fotofase: 12h e UR:  $70 \pm 10\%$ .

Parâmetros de produção de poliedros virais <sup>1*</sup>					
Dietas	LE	OB/total (x 10 <sup>8</sup> ) <sup>1</sup>	OB/lag (x 10 <sup>8</sup> )	OB/100 lag (x10 <sup>8</sup> )	OB/g (x10 <sup>8</sup> )
D2	274,21 ± 23,33 a	134,90 ± 11,35 a	11,56 ± 1,07 a	1116,01 ± 98,19 a	84,34 ± 3,30 a
D8	76601,41 ± 9460,26 d	0,55 ± 0,09 d	0,05 ± 0,007 d	4,55 ± 0,78 d	4,16 ± 0,48 d
D9	71868,08 ± 7926,16 d	0,56 ± 0,08 d	0,05 ± 0,007 d	4,68 ± 0,69 d	4,42 ± 0,76 d
D10	23545,38 ± 5628,98 b	2,26 ± 0,57 b	0,18 ± 0,004 b	18,82 ± 4,73 b	13,54 ± 2,84 b
D11	14065,05 ± 1697,22 b	3,01 ± 0,59 b	0,25 ± 0,05 b	25,05 ± 4,93 b	14,21 ± 2,15 b
D12	114853,24 ± 29511,87 d	0,49 ± 0,11 d	0,04 ± 0,009 d	4,07 ± 0,93 d	3,01 ± 0,64 d
D13	33284,48 ± 5468,69 c	1,31 ± 0,21 c	0,11 ± 0,01 c	10,91 ± 1,74 c	7,90 ± 1,42 c

<sup>1</sup>Médias seguidas por uma mesma letra na coluna não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

\*Os dados foram transformados em log (x);

**Tabela 6** - Parâmetros de produção de poliedros virais em dietas alternativas da terceira etapa para inoculação de SfMNPV em lagartas de 8 dias de *S. frugiperda* desenvolvidas na temperatura de  $25 \pm 1$  °C. Fotofase: 12h e UR:  $70 \pm 10\%$ . E percentagem de proteína bruta (PB (%)) das lagartas alimentadas com as dietas de inoculação.

Dietas	Parâmetros de produção de poliedros virais <sup>1*</sup>					
	LE	OBtotal (x 10 <sup>8</sup> ) <sup>1</sup>	OB/lag (x 10 <sup>8</sup> )	OB/100 lag (x10 <sup>8</sup> )	OB/g (x10 <sup>8</sup> )	PB (%)
<b>D2</b>	218,05 ± 9,77 a	158,34 ± 7,87 a	13,96 ± 0,65 a	1330,03 ± 44,19 a	67,12 ± 3,76 b	28,54 ± 3,58 b
<b>D15</b>	282,30 ± 28,19 a	134,75 ± 0,09 a	11,42 ± 1,20 a	1122,92 ± 105,44 a	90,12 ± 6,07 a	27,98 ± 2,99 b
<b>D7</b>	399,99 ± 22,39 b	90,72 ± 4,37 b	7,64 ± 0,37 b	764,35 ± 36,74 b	79,35 ± 5,04 ab	24,55 ± 2,38 b
<b>D14</b>	2159,01 ± 196,60 c	17,24 ± 2,14 c	1,50 ± 0,16 c	142,34 ± 17,93 c	7,16 ± 0,52 d	19,56 ± 2,11 b
<b>D11</b>	3360,17 ± 343,94 d	11,36 ± 12,65 d	0,94 ± 0,07 c	94,64 ± 7,69 d	41,57 ± 2,45 c	42, 25 ± 2,37 a

<sup>1</sup>Médias seguidas por uma mesma letra na coluna não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

\*Os dados foram transformados em log (x);

## 5 CAPÍTULO IV: DIETA SIMPLIFICADA E SEM AQUECIMENTO PARA INOCULAÇÃO *IN VIVO* DE *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV)

### RESUMO

A inoculação de entomopatógenos virais *in vivo* requer estudo de cada patossistema. Diversos fatores interferem no custo de produção e conseqüentemente na disponibilidade de formulações a base de vírus. Para o vírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV), empregado no manejo da lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), fatores como o hábito canibal do hospedeiro, a temperatura e a dieta artificial de inoculação viral são importantes de serem pesquisados. Nesse trabalho propomos avaliar uma dieta a base de proteína de soja texturizada, sem aquecimento no preparo, para a inoculação viral e uma dieta artificial de composição simplificada, à base de germen de trigo, para concluir a alimentação das lagartas durante a etapa de inoculação viral em grupos de insetos. Lagartas de *S. frugiperda* foram inoculadas com o vírus SfMNPV em duas dietas: dieta artificial semelhante à da multiplicação massal do hospedeiro e proteína de soja texturizada nas temperaturas e respectivas idades: à 25 °C com 6 e 8 dias após a eclosão e 31 °C de 4 e 6 dias após a eclosão das lagartas. E, posteriormente, avaliou-se a inoculação viral em grupo de 300 lagartas em diferentes condições de tempo e temperatura de incubação complementando-se a alimentação nessa fase com dieta de composição simplificada. Os resultados evidenciam que é possível inocular vírus sem perdas de produção de poliedros virais em dieta à base de proteína de soja texturizada, e complementar a alimentação das lagartas com dieta artificial de composição simplificada para concluir a etapa de infecção viral em grupos de insetos infectados.

**Palavras chave:** Baculoviridae. *Spodoptera frugiperda*. Produção massal. Dieta artificial.

## **SIMPLIFIED AND COOL TEXTURING DIET FOR IN VIVO INOCULATION OF *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV)**

### **ABSTRACT**

The inoculation of viral entomopathogens in vivo requires study of each pathosystem. Several factors interfere in the cost of production and consequently in the availability of virus-based formulations. For the *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV), employed in the management of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*, factors such as host cannibal habit, temperature, and artificial diet of viral inoculation are important to research. In this work we propose to evaluate a diet based on textured soy protein, without heating during preparation, for viral inoculation and an artificial diet of simplified composition, based on wheat germ, to complete the feeding of larvae during the stage of viral inoculation in groups of insects. *S. frugiperda* larvae were inoculated with SfMNPV virus in two diets: an artificial diet similar to that of mass rearing of the host and texturized soy protein at the following temperatures and respective ages: at 25 °C at 6 and 8 days after hatching and 31 °C at 4 and 6 days after larvae hatching. And, subsequently, viral inoculation was evaluated in a group of 300 larvae under different incubation times and temperature conditions, complementing feeding at this stage with a diet of simplified composition. The results show that it is possible to inoculate viruses without loss of viral polyhedra production in a textured soy protein-based diet and supplement the larvae diet with an artificial diet of simplified composition to complete the viral infection stage in groups of infected insects.

**Keywords:** Artificial diet. Baculoviridae. *Spodoptera frugiperda*. Mass production.

## 5.1 INTRODUÇÃO

Os baculovírus são promissores para a formulação de produtos biológicos, demonstrando eficácia para o manejo de pragas (VALICENTE et al., 2013; GRZYWACZ; MOORE, 2017; SOSA-GÓMEZ et al., 2020). No Brasil o manejo de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura da soja foi que incentivou a utilização do controle microbiano com vírus entomopatogênico (MOSCARDI, 1999; MOSCARDI et al., 2011). E após o surto com *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) no país, a partir de 2018, algumas formulações para controle de espécies de *Heliothinae*, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) foram registradas, dentre as quais o vírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) que é empregado no manejo da lagarta do cartucho *S. frugiperda* (ARDISSON-ARAÚJO et al., 2015; SOSA-GÓMEZ et al., 2020).

O sistema de produção *in vivo* é o empregado para a formulação dos bioinseticidas a base de SfMNPV (VALICENTE et al., 2010). A eficiência da multiplicação massal do inseto, os custos de infraestrutura, manejo e dieta artificial ou natural interferem diretamente na viabilidade da produção em larga escala no custo de produção (ARDISSON-ARAÚJO et al., 2015; SAYED et al., 2021). Logo a inoculação de entomopatógenos virais em sistemas de produção *in vivo* requer estudos voltados para o patógeno-hospedeiro, devido as particularidades envolvidas em cada patossistema, tais como o substrato alimentar e a temperatura de inoculação viral (STINGUEL et al., 2022; ZAMORA-AVILÉS et al., 2017; SUBRAMANIAN et al., 2006).

Para otimizar a técnica de produção *in vivo* as pesquisas conduzem ensaios envolvendo a seleção de isolados virais (VALICENTE et al., 2010; VIEIRA et al., 2012), dietas para inoculação (ELVIRA et al., 2010a; ZAMORA-AVILÉS et al., 2017; SAYED et al., 2021), idade das lagartas e temperatura ideal para inoculação (RIOS-VELASCO et al., 2012; SUBRAMANIAN et al., 2006), qualidade do estoque viral (SUBRAMANIAN et al., 2006; RAMÍREZ-ARIAS et al., 2019), aumento do rendimento de poliedros virais (RAMÍREZ-ARIAS et al., 2019), redução do canibalismo e substratos de inoculação (ELVIRA et al., 2010a; VALICENTE et al., 2013; MACHADO et al., 2021), substâncias de ação hormonal (ELVIRA et al., 2010a).

Na produção *in vivo* a inoculação viral é realizada por meio de dieta artificial semelhante à usada na multiplicação massal do hospedeiro, com restrição para o formaldeído (VALICENTE et al., 2010). Porém após a infecção viral a lagarta permanece alimentando-se por mais dois a três dias, e aos poucos essa alimentação é reduzida. Logo a utilização de uma dieta artificial completa, nutricionalmente equilibrada, não seja necessária uma vez que o inseto não completará o desenvolvimento. Assim, a falta de publicações disponíveis em relação ao estudo de uma dieta para inoculação viral que proporcione a produção de poliedros equivalente a dieta usada na criação massal do hospedeiro e que promova redução dos custos com ingredientes é passível de ser analisada.

Outro quesito que vem sendo pesquisado é a inoculação homogênea do lote de lagartas (ZAMORA-AVILÉS et al., 2017). Para isso, estudos estão sendo desenvolvidos com intuito de adicionar o vírus durante o preparo da dieta, de forma a torná-la homogênea para alimentação e conseqüentemente garantir uma maior uniformidade na infecção viral por lote produzido (ZAMORA-AVILÉS et al., 2017).

Como a dieta padrão com ágar ou carragenina necessita de aquecimento durante o preparo, sempre é necessário avaliar a temperatura no momento da inoculação viral para não inativar os poliedros virais ao adicioná-los ao meio (RIBEIRO; PAVAN, 1994). Para o preparo de dietas existem diversos gelificantes como: alginatos, gelatinas, gomas, glutina, lecitina de soja, CMC (carboximetilcelulose) e recentemente amido de mandioca (PARRA, 2009; SAYED et al., 2021). O estudo de gelificantes que não necessite de aquecimento em substituição ao ágar ou carragenina facilitaria o processo de preparo e mistura do vírus, além de conferir maior homogeneidade à dieta em relação quando os corpos de inclusão poliédrica são inoculados apenas superficialmente (ZAMORA-AVILÉS et al., 2017).

E ainda, propor uma opção de dieta artificial para a inoculação viral que contenha uma composição mais simples e cujo as modificações na composição atendam às exigências nutricionais básicas do inseto durante o período de incubação do vírus, período no qual há uma redução da alimentação, e promovam a infecção viral sem grandes contaminações e perdas de produção precisam ser avaliadas. O objetivo deste estudo foi propor uma dieta de textura fria a base de proteína de soja texturizada para a inoculação *in vivo* de SfMNPV no seu hospedeiro natural *S. frugiperda* e uma dieta artificial complementar de composição mais simples, em

relação à dieta artificial de utilizada para multiplicação massal, para a produção de vírus em grupo de lagartas.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Controle Microbiano de Insetos, Setor de Entomologia do NUDEMAFI (Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças) localizado no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE/UFES), em Alegre, Espírito Santo, Brasil.

### 5.2.1 Criação massal e manutenção de *Spodoptera frugiperda*

A multiplicação e manutenção foram realizadas em sala climatizada a temperatura de  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa de 60% e fotofase de 12 horas. Os adultos foram mantidos em gaiola de PVC alimentados por meio de algodão embebido em solução de sacarose a 10%. Para a oviposição, foram utilizadas folhas de papel branco recobrando o interior das gaiolas, sendo retiradas a cada dois dias para a remoção das posturas. As posturas foram mantidas em potes plásticos transparentes até a eclosão dos neonatos. Estes foram transferidos com o auxílio de um pincel de cerdas macias para recipientes plásticos (100 mL) contendo dieta artificial adaptada à base de feijão, germe de trigo, levedura de cerveja e carragenina descrita por Nalim (1991), permanecendo por cinco dias. Posteriormente foram transferidas aproximadamente 40 lagartas para recipiente de acrílico tipo gerbox<sup>®</sup> (dimensões de 11 x 11 x 3 cm) e após 10 dias foram individualizadas em gerbox<sup>®</sup> (3 cm diâmetro) até a formação de pupa. Com a emergência dos adultos, os mesmos foram transferidos para as gaiolas de criação, dando continuidade ao ciclo.

### 5.2.2 Obtenção e produção de SfMNPV

Para o bioensaio foi utilizado o isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV), proveniente do Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo, por não ocasionar a liquefação do tegumento imediatamente após a morte do inseto (VIEIRA et al., 2012). A multiplicação do vírus foi feita a partir de uma suspensão inicial na concentração de

$1 \times 10^8$  OB/mL, em que pedaços de dieta artificial (sem adição de formaldeído) foram imersas e oferecidas para as lagartas de *S. frugiperda* alimentarem-se. Os insetos foram mantidos individualizados em recipientes plásticos (50 mL), repondo a dieta artificial sempre que necessário. Após a infecção e morte os cadáveres foram recolhidos e congelados para posteriormente serem macerados e purificados.

A purificação seguiu a metodologia proposta por Hashimoto et al. (2000) com modificações, as lagartas infectadas foram maceradas em água destilada autoclavada contendo SDS a 1% (Dodecil Sulfato de Sódio) e filtrada em tecido voile com intuito de facilitar a remoção do tecido gorduroso da lagarta e separar o líquido resultante das partes mais grosseiras da lagarta. O filtrado foi deixado sob agitação orbital a 250 rpm por 30 minutos. Posteriormente, procedeu-se com a centrifugação a 6.000 rpm/20 minutos, repedindo-se esse procedimento por três vezes. Após a última centrifugação o precipitado obtido foi ressuspenso em água destilada esterilizada e armazenado a 4 °C para serem posteriormente empregadas no bioensaio.

### **5.2.3 Determinação da temperatura e idade ideal de *S. frugiperda* para inoculação de SfMNPV em dieta fria**

Para a seleção da dieta fria para uso na produção do nucleopoliedrovírus de *S. frugiperda* foram realizados experimentos preliminares com gelificante em diferentes concentrações de alginato (1; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,5%) e cloreto de cálcio (2 e 5%). Contudo não foram obtidos resultados satisfatórios no enrijecimento das dietas, ou quando obtido, a alimentação das lagartas foi inibida. Desta forma optou-se por trabalhar com uma dieta para inoculação a base de proteína de soja texturizada. Um ensaio preliminar foi realizado com a finalidade de constatar se a alimentação das lagartas durante o período de 24h, correspondente ao período de inoculação em proteína de soja texturizada, afetaria o ganho de peso em relação à dieta artificial. O peso inicial e final em 24h de alimentação com dieta artificial e proteína de soja texturizada foram medidos e a diferença entre os pesos comparada estatisticamente. Esse ensaio foi realizado com lagartas criadas a 31 °C por 4 dias; 31 °C por 6 dias; 25 °C por 6 dias; 25 °C por 8 dias, com oito repetições contendo 10 insetos por repetição.



Não havendo interferência no ganho de peso dessas idades com relação ao uso de proteína de soja texturizada por 24h, prosseguiu-se com o bioensaio verificando-se os parâmetros de produção viral.

Para isso, foi preparada uma solução de vírus na concentração  $1 \times 10^8$  OB/mL. A concentração foi determinada por contagem dos OBs em câmara de Neubauer com microscópio óptico e aumento de 400 vezes. Foram comparadas as dietas: proteína de soja texturizada (10g/repetição), que foi embebida na solução de vírus na concentração  $1 \times 10^8$  OB/mL por um período de 3 horas antes de ser ofertada para alimentação; e dieta artificial sem formaldeído inoculada com vírus na mesma concentração sob a superfície; e a testemunha, que consiste na dieta padrão sem vírus. Em cada uma dessas dietas (dieta padrão e proteína de soja texturizada) foram inoculadas lagartas criadas à 25 °C com 6 e 8 dias após a eclosão e 31 °C de 4 e 6 dias. Perfazendo 8 tratamentos com 8 repetições de 12 insetos/repetição, para facilitar os tratamentos foram distinguidos de T1 a T8 conforme especificado a seguir (Tabela 1). É válido ressaltar que foi feito os tratamentos referentes a testemunha para cada uma das condições avaliadas em dieta artificial, afim de garantir a sanidade do lote amostral.

Os insetos se alimentaram desses tratamentos por 24h em seguida foram individualizados em dieta artificial e acondicionados em sala climatizada à 25 °C. As lagartas mortas de cada tratamento foram contabilizadas, pesadas e armazenadas a 4 °C para posterior purificação e quantificação dos corpos poliédricos oclusão (OBs). Foram avaliados: (1) Corpos de oclusão por lagarta (OB/lagarta): OB total/pelo número de lagartas coletadas de cada repetição; (2) Corpos de oclusão por grama (OB/g): OB total/pelo peso das lagartas coletadas de cada repetição; (3) lagarta equivalente (LE):  $3 \times 10^{11}$ /OB/lagarta de cada repetição, parâmetro que corresponde ao número de lagartas necessárias para obtenção de uma dose comercial de  $3,0 \times 10^{11}$  OB para pulverizar um hectare (MAPA, 2015); (4) Corpos de oclusão pelo número de lagartas mortas a cada 100 lagartas inoculadas (OB/100 Lagartas): porcentagem de mortalidade\*OB/lagarta. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a análise de variância ao nível de 5% de probabilidade. Para os dados que não atenderam os requisitos quanto a normalidade e homoscedasticidade, procedeu-se com teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis em nível de 5% de probabilidade. Quando significativo procedeu-se com o teste de comparações múltiplas (Dunn).

#### 5.2.4 Produção em escala média de SfMNPV em lagartas de *S. frugiperda* inoculadas em proteína texturizada de soja

Para analisar a produção em escala média do nucleopoliedrovírus de *S. frugiperda* selecionou-se o tratamento do bioensaio anterior que utilizou a dieta artificial a base de proteína de soja texturizada e as lagartas foram multiplicadas a 31 °C por um período de 6 dias, pois igualou-se a maioria dos tratamentos nos parâmetros avaliados. Para isso foi usado como unidade amostral um recipiente plástico (7cm altura; 36,6 cm comprimento e 26 cm de largura), com tampa contendo uma abertura para ventilação de 5 x 5 cm recoberta com tecido *voile*, constituindo a unidade amostral. Em cada unidade havia 10 gramas de proteína de soja texturizada embebida com vírus SfMNPV na concentração  $1 \times 10^8$  OB/mL por 3 horas antes de ser ofertada para alimentação. Foram inoculadas 300 lagartas de *S. frugiperda* criadas à 31 °C com 6 dias por 24h nessa fonte de alimento à 31 °C e, após esse período, foram adicionados aproximadamente 30 pedaços de dieta artificial (5g/pedaço), a mesma usada na multiplicação massal, submetendo-se aos seguintes tratamentos de condições para incubação:

C1: Incubar por mais 3 dias à 31 °C e depois 3 dias à 22 °C.

C2: Incubar por mais 4 dias à 31 °C

C3: Incubar por mais 2 dias à 31 °C e depois 4 dias à 22 °C. Ressalta-se que o intuito da temperatura de 31 °C é para proporcionar o crescimento das lagartas. E depois submeter a temperatura mais baixa (22 °C) para reduzir o canibalismo e contaminação e proporcionar mais tempo para replicação viral.

Após selecionar a melhor condição de incubação, realizou-se um bioensaio complementar para comparar o fornecimento da dieta artificial padrão (Nalim 1991) e de uma dieta artificial mais simples (gérmen de trigo (66,3g/L de água), ácido ascórbico (4,27g/ L de água), nipagin (2,64g/ L de água) e carragenina (30g/L de água)) na produção de poliedros virais de SfMNPV. O intuito foi verificar a possibilidade do uso de uma dieta mais econômica nesse curto período de inoculação viral. O delineamento experimental e estatístico seguiu o mesmo procedimento do bioensaio anterior.

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 Determinação da temperatura e idade ideal de *S. frugiperda* para inoculação de SfMNPV em dieta fria

Por meio do teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ), foram determinadas diferenças significativas para os parâmetros avaliados entre as dietas testadas (Tabela 2, 3, 4 e 5). O tratamento T2 a base de dieta artificial, exceto para o parâmetro OB/g cujo diferiu-se de T3, T4, T5 e T7, o mesmo apresentou resultados similares nos demais parâmetros diferindo-se apenas de T4 e T8. O tratamento T2 consiste em dieta artificial cujo o vírus fora pipetado superficialmente, e ao analisar dentre os tratamentos do vírus embebido em proteína de soja texturizada, o que demonstrou similar a T2 foi o tratamento T7 que avaliou as lagartas de 6 dias de idade submetidas a 31 °C. Esse igualou-se aos tratamentos T1, T2 e T3 a base de dieta artificial e T5 e T6 em proteína de soja texturizada. Para o parâmetro OB/g o tratamento T7 se igualou a todos os demais tratamentos, exceto T2. E para os parâmetros OB/100 lagartas, OB/lagarta e lagarta equivalente (LE) diferiu apenas de T4 e T8 os quais referem-se as lagartas submetidas a 31 °C por 4 dias independentemente do substrato de inoculação (Tabela 2, 3, 4 e 5). Esse resultado evidencia que mesmo as lagartas se alimentando apenas de proteína texturizada durante 24h não interferiu na produção viral. Pode-se perceber que a média de OB/lagartas foi de  $2,08E+11$ , bem próximos dos valores obtidos para os tratamentos T1 e T2 à base de dieta padrão da criação, que foram de  $2,61E+11$  e  $1,46 E+11$ , respectivamente (Tabela 2).

A produção do vírus entomopatogênico de *S. frugiperda* para escala comercial é *in vivo* e enfrenta diversos desafios para o êxito na eficiência da multiplicação massal, principalmente os custos de infraestrutura, manejo e dieta artificial ou natural do hospedeiro (ARDISSON-ARAÚJO et al., 2015; SAYED et al., 2021). Logo a inoculação de entomopatógenos virais em sistemas de produção *in vivo* requer estudos voltados para o vírus-hospedeiro, devido as particularidades envolvidas em cada patossistema, tais como o substrato alimentar e a temperatura de inoculação viral, por exemplo (STINGUEL et al., 2022; ZAMORA-AVILÉS et al., 2017; SUBRAMANIAN et. al., 2006).

O baculovírus, que tem como hospedeiro a lagarta-do-cartucho *S. frugiperda*, pode ser inoculado em folhas de milho, mamona, ou até mesmo na dieta artificial

idêntica à usada na multiplicação massal com exceção para o formaldeído (STINGUEL et al., 2022; MACHADO et al., 2021; VALICENTE et al., 2010). A inoculação em dieta artificial é feita após o resfriamento ou pipetada superficialmente e isso surge como desafio para assegurar uma infecção homogênea dos lotes de lagartas (ZAMORA-AVILÉS et al., 2017; MACHADO et al., 2021).

A mistura do vírus incorporado à dieta artificial necessita ser feita após o resfriamento da deita, em torno de 50 °C, para evitar a inativação viral (CAMACHO et al., 2013; ZAMORA-AVILÉS et al., 2017). E quando aplicado em superfície, algumas lagartas alimentam-se dos corpos de oclusão da superfície e outras da parte pouco contaminada, podendo haver uma heterogeneidade na infecção do lote (MACHADO et al. 2021; ZAMORA-AVILÉS et al., 2017). Estudos que viabilizem uma dieta de textura fria torna-se alvo para pesquisa afim de solucionar tais problemas enfrentados nas biofábricas.

O resultado obtido nesse estudo possibilita propor mudanças no processo de inoculação viral. A proteína de soja texturizada se destacou como uma alternativa de dieta para essa finalidade, sem haver prejuízos na infectividade viral, inativação térmica e nem quanto ao ganho de peso larval. O uso de proteína de soja texturizada permite embeber a proteína com o vírus sem preocupar-se com a temperatura e a inativação do mesmo. Além disso a superfície específica da proteína é muito maior que a da dieta artificial, havendo uma maior possibilidade de inanição do vírus e consequentemente lotes mais homogêneos.

Um dos objetivos da pesquisa é minimizar custos durante o processo produtivo (SOSA-GÓMEZ et al., 2020; MOSCARDI et al., 2011). Atualmente o vírus SfMNPV é inoculado em dieta artificial idêntica à usada na multiplicação massal do hospedeiro com exceção para o formaldeído (MACHADO et al., 2021; STINGUEL et al., 2022). Contudo, parte desta dieta acaba sendo descartada devido a morte das lagartas e/ou cessarem a alimentação devido o processo de infecção viral.

Logo, torna-se ainda mais importante a seleção de uma dieta de baixo custo e que não interfira na produtividade de corpos de oclusão pelo menos na etapa do processo de inoculação viral. Nesse estudo a dieta a base de gérmen de trigo demonstrou ser uma excelente alternativa para complementar a alimentação das lagartas infectadas nessa etapa do processo, pois não interferiu na produção de vírus e tem a vantagem de ser mais econômica que a dieta artificial usada na multiplicação massal do hospedeiro, em relação a quantidade de ingredientes que a compõe. O

estudo de uma dieta de baixo custo e que não interfira na produtividade viral, por exemplo, também foi pesquisada para o vírus da lagarta *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) (ELVIRA et al., 2010b).

### **5.3.2 Produção em escala média de SfMNPV em lagartas de *S. frugiperda* inoculadas em proteína texturizada de soja**

Os resultados demonstram que independentemente da condição de incubação a produção de poliedros não foi alterada (Tabela 6). Desta forma optou-se por escolher a condição de incubação 4 dias/31 °C, pois possui um tempo menor de incubação (96 horas) e apenas uma temperatura (31 °C). Na comparação entre as dietas a base de gérmen de trigo e a usada na multiplicação massal na condição de incubação 4 dias/31 °C, pode-se perceber que não houve interferência no peso e na produção de poliedros em relação as dietas testadas (Tabela 7). Esse resultado é importante pois além de adicionar o vírus em uma dieta fria, a reposição alimentar também é com uma dieta mais econômica. Desta forma os custos com a inoculação viral podem ser reduzidos.

Quanto a condição de incubação do vírus, estudos anteriores demonstram que temperaturas mais baixas reduzem o canibalismo e contaminação, além de proporcionar mais tempo para replicação viral (SUBRAMANIAN et al., 2006; STINGUEL et al., 2022). Porém independentemente da condição testada nesse estudo, alternando 31 °C e 22 °C ou mantendo a 31 °C, não houve diferença estatística. A condição de incubação de 31 °C por 4 dias (C2) também foi analisada por Machado et al. (2021) que encontraram resultados satisfatórios para a produção de SfMNPV em recipientes contendo diferentes densidades de lagartas de *S. frugiperda*.

A produção de OB por recipiente foi de  $1,50 \times 10^{11}$  na condição C2, e quando esta foi comparada complementado a alimentação com a dieta usada na criação massal do hospedeiro (D2) e dieta a base de gérmen de trigo (D7) a produção de OB por recipiente foi de  $8,60 \times 10^{10}$  e  $7,18 \times 10^{10}$  OB/g, respectivamente. Zamora-Avilés et al. (2017) inoculando 250 lagartas de *S. exigua* obtiveram valores médios de  $6,0 \times 10^6$  e  $8,9 \times 10^6$  OB/g para dieta a base de ágar e fibra de soja, respectivamente. E ainda esses autores observaram necrofagia e um alto nível de canibalismo, coletando-

se apenas em torno de 25 a 35% do número inicial de lagartas inoculadas. Stinguel et al. (2022) avaliando o canibalismo em lagartas de *S. frugiperda* inoculadas em grupos, entretanto o substrato utilizado foram folhas de mamona, o valor de canibalismo atingiu 50% na densidade de 50 lagartas/recipiente e apontam a necessidade de estudos futuros da produção de OB por lagartas não canibalizadas criadas em grupos.

Estudos que propõem a inoculação viral em grupos de lagartas de *S. frugiperda* ainda são escassos na literatura, e em geral, o hábito canibal interfere nos avanços com resultados satisfatórios para a produção viral. Dessa forma, torna-se essencial a realização de pesquisas que associem substâncias junto à dieta de inoculação que possam minimizar as taxas de canibalismo e melhorar o desempenho da produtividade de OB/g. A partir dos resultados obtidos nessa pesquisa em relação ao processo de inoculação viral, o uso de dieta fria a base de proteína texturizada de soja e o complemento da alimentação com dieta a base de gérmen de trigo, podem reduzir os custos e contribuir para adaptações em uma escala massal de produção de SfMNPV.

#### 5.4 CONCLUSÃO

A proteína de soja texturizada pode ser utilizada para a inoculação de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV). Lagartas de *S. frugiperda* inoculadas nessa fonte de alimento à 31 °C com idade de 6 dias por 24h apresentou um bom desempenho na produção viral.

A dieta artificial de composição simplificada a base de gérmen de trigo pode ser empregada para complementar a alimentação após a infecção viral das lagartas inoculadas em grupo de 300 indivíduos. E a condição de incubação ideal foi de 4 dias à 31 °C.

#### 5.5 REFERÊNCIAS

ARDISSON-ARAÚJO, D.M.P.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; MELO, F.L.; BÁO, S.N.; RIBEIRO, B.M. Characterization of *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus isolated in Brazil during the first old world bollworm (Noctuidae: *Helicoverpa armigera*) nationwide outbreak. **Virus Reviews and Research**, v.20, p.1-4, 2015.

CAMACHO, E. J.; GÓMEZ, I. M.; VILLAMIZAR, F. L. Efecto de la temperatura y de los procesos de secado sobre la actividad insecticida de un nucleopoliedrovirus de

*Spodoptera frugiperda*. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v.12, n.3, p. 437-450, 2013.

ELVIRA, S.; GORRIA, N.; MUNOZ, D.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. A simplified low-cost diet for rearing *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and its effect on *S. exigua* nucleopolyhedrovirus production. **Journal of Economic Entomology**, v.103, n.1, p.17-24, 2010.

ELVIRA, S.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. Juvenile hormone analog technology: effects on larval cannibalism and the production of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. **Journal of economic entomology**, v.103, n.3, p. 577-582, 2010.

GRZYWACZ, D., MOORE, S., 2017. Production, formulation, and bioassay of baculoviruses for pest control. In: Lacey, L.A. (Ed.), **Microbial Control of Insect and Mite Pests. From Theory to Practice**. Academic Press, San Diego, CA, p. 109–124.

HASHIMOTO, Y.; HAYASHI, K.; HAYAKAWA, T.; UENO, Y.; SHIMOJO, E.I.; KONDO, A.; MIYASONO, M.; SANO, Y.; MATSUMOTO, T.; GRANADOS, R.R. Physical map of a *Plutella xylostella* granulovirus genome. **Applied Entomology and Zoology**, v.35, n.1, p.45-51, 2000.

MACHADO, L.C.; SANTOS JUNIOR, H. J. G. DOS; MAURI, L.V.R.; GUILHEN, J.H.S.; PAIVA, C.E.C. Aperfeiçoamento da Técnica de Produção Massal *in vivo* de Baculovírus *spodoptera*. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v.14, n.3, p.1-13, 2021.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v.44, p.257-289, 1999.

MOSCARDI, F.; SOUZA, M.L.; CASTRO, M.E.B.; MOSCARDI, M.L.; SZEWCZYK, B. (2011). Baculovirus Pesticides: Present State and Future Perspectives. In: I., Ahmad, F., Ahmad, & J., Pichtel (Eds.), **Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications**. Nova York: Springer, p.415-445, 2011.

NALIM, D. M. (1991). Biologia, nutrição quantitativa e controle de qualidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais. Universidade de São Paulo Biblioteca digital da USP.

PARRA, J.R.P. (2009). A evolução das dietas artificiais e suas interações em ciência e tecnologia. In: A.R., PANIZZI; J.R.P., PARRA (Eds.), **Bioecologia e nutrição de insetos Base para o manejo integrado de pragas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.91-174.

RAMÍREZ-ARIAS, F.G.; LASA, R.; MURILLO, R.; NAVARRO-DE-LA-FUENTE, L.; GABRIEL MERCADO, G.; WILLIAMS, T. Post-mortem incubation influences occlusion body production in nucleopolyhedrovirus-infected larvae of *Spodoptera frugiperda*. **Biological Control**, v.135, p. 33-40, 2019.

RIBEIRO, H.C.T.; PAVAN, O.H. Baculovirus thermal stability. **Journal of thermal biology**, v.19, n.1, p.21-24, 1994.

RIOS-VELASCO, C.; GALLEGOS-MORALES, G.; BERLANGA-REYES, D., CAMBERO-CAMPOS, J.; ROMO-CHACÓN, A. Mortality and production of occlusion bodies in *Spodoptera frugiperda* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) treated with nucleopolyhedrovirus. **Florida Entomologist**, v.95, n.3, p.752-757, 2012.

SAYED, W.A.A.; EL-HELALY, A.; JAMAL, Z. A.; EL-BENDARY, H. Effect of a low cost diet on the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrosis virus pathogenicity and sterile insect technique. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v.31, n.117, p.1-8, 2021.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; MORGADO, F.S.; CORRÊA, R.F.T.; SILVA, L.A., ARDISSON-ARAÚJO, D.M.P.; RODRIGUES, B.M.P.; OLIVEIRA, E.E., AGUIAR, R.W.S.; RIBEIRO, B.M. Entomopathogenic Viruses in the Neotropics: Current Status and Recently Discovered Species. **Neotropical Entomology**, v.49, p.315–331, 2020.

STINGUEL, P.; PAIVA, C.E.C.; ZUIM, V.; AZEVEDO, A.C.T.; VALICENTE, F.H.; DOS SANTOS JÚNIOR, H.J.G. Optimization of In Vivo Production of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV). **Neotropical Entomology**, v.51, n.1, p.122-132, 2022.

SUBRAMANIAN, S.; SANTHARAM, G.; SATHIAH, N.; KENNEDY, J.S.; RABINDRA, R.J. Influence of incubation temperature on productivity and quality of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. **Biological Control**, v.37, n.3, p. 367-374, 2006.

VALICENTE, F.H.; TUELHER, E.S.; PENA, R.C.; ANDREAZZA, R.; GUIMARÃES, M.R.F. Cannibalism and virus production in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae fed with two leaf substrates inoculated with Baculovirus *spodoptera*. **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 2, p. 191-199, 2013.

VALICENTE, F.H.; TULHER, E.S.; BARROS, E.C. **Processo de produção comercial de baculovírus em grande escala**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2010. 6p. (Circular Técnica, 157).

VIEIRA, C.M.; TUELHER, E.S.; VALICENTE, F.H.; WOLFF, J.L.C. Characterization of a *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus isolate that does not liquefy the integument of infected larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.111, n,2, p.189-192, 2012.

ZAMORA-AVILÉS, N.; MARTÍNEZ, A.M.; PINEDA, S.; BRAVO-PATIÑO, A.; FIGUEROA, I.; LASA, R. Cool-textured diets for use in baculovirus production. **Biocontrol Science and Technology**, v.27, n.11, p. 1327-1338, 2017.



**Tabela 1** - Especificação dos tratamentos conforme a dieta para alimentação e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda*.

<b>Tratamento</b>	<b>Especificação dieta/criação das lagartas</b>
<b>T1</b>	Dieta padrão <sup>1</sup> 25 °C por 8 dias
<b>T2</b>	Dieta padrão 25 °C por 6 dias
<b>T3</b>	Dieta padrão 31 °C por 6 dias
<b>T4</b>	Dieta padrão 31 °C por 4 dias
<b>T5</b>	Proteína texturizada de soja 25 °C por 8 dias
<b>T6</b>	Proteína texturizada de soja 25 °C por 6 dias
<b>T7</b>	Proteína texturizada de soja 31 °C por 6 dias
<b>T8</b>	Proteína texturizada de soja 31 °C por 4 dias

<sup>1</sup> Dieta artificial usada para multiplicação massal de *S. frugiperda* modificada descrita por Nalim (1991).

**Tabela 2** - Parâmetro de produção OB/100 lagarta de SfMNPV conforme a especificação de dieta para alimentação e desenvolvimento larval (T1 a T8) de *Spodoptera frugiperda*.

	OB/ 100 lagartas							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<b>T2</b>	0,0274	-	-	-	-	-	-	-
<b>T3</b>	0,1754	0,1618	-	-	-	-	-	-
<b>T4</b>	0,0000*	0,0037*	0,0001*	-	-	-	-	-
<b>T5</b>	0,1071	0,2489	0,3787	0,0004*	-	-	-	-
<b>T6</b>	0,0002*	0,0573	0,0052*	0,1354	0,0120*	-	-	-
<b>T7</b>	0,0296	0,4866	0,1702	0,0033*	0,2596	0,0536	-	-
<b>T8</b>	0,0000*	0,0011*	0,0000*	0,3485	0,0001*	0,0681	0,0010*	-
<b>Média</b>	2,61 E+11	1,46E+11	2,31E+11	3,53E+10	1,48E+11	5,96E+10	2,08E+11	3,02E+10
<b>Qui-quadrado</b>	44,97							
<b>Graus de liberdade</b>	7							
<b>p-valor</b>	< 0,01							

\*Valores p-valor diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de comparação múltipla (teste de Dunn).

**Tabela 3** - Parâmetro de produção OB/g de SfMNPV conforme a especificação de dieta para alimentação e desenvolvimento larval (T1 a T8) de *Spodoptera frugiperda*.

	OB/g							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<b>T2</b>	0,0698	-	-	-	-	-	-	-
<b>T3</b>	0,3144	0,0250*	-	-	-	-	-	-
<b>T4</b>	0,1011	0,0030*	0,2141	-	-	-	-	-
<b>T5</b>	0,0919	0,0025*	0,1988	0,4786	-	-	-	-
<b>T6</b>	0,3941	0,0404	0,4149	0,1570	0,1444	-	-	-
<b>T7</b>	0,0404	0,0006*	0,1034	0,3192	0,3386	0,0698	-	-
<b>T8</b>	0,4679	0,0813	0,2864	0,0875	0,0793	0,3635	0,0339	-
<b>Média</b>	1,00 E+10	1,98 E+10	1,33 E+10	7,48 E+09	7,36 E+09	8,55 E+09	9,27 E+09	1,14 E+10
<b>Qui-quadrado</b>	14,73							
<b>Graus de liberdade</b>	7							
<b>p-valor</b>	< 0,04							

\*Valores p-valor diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de comparação múltipla (teste de Dunn).

**Tabela 4** - Parâmetro de Lagarta Equivalente (LE) de SfMNPV conforme a especificação de dieta para alimentação e desenvolvimento larval (T1 a T8) de *Spodoptera frugiperda*.

	Lagarta Equivalente LE							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<b>T2</b>	0,0416	-	-	-	-	-	-	-
<b>T3</b>	0,3444	0,0835	-	-	-	-	-	-
<b>T4</b>	0,0000*	0,0023*	0,0000*	-	-	-	-	-
<b>T5</b>	0,1022	0,3218	0,1826	0,0005*	-	-	-	-
<b>T6</b>	0,0004*	0,0519	0,0011*	0,1144	0,0183*	-	-	-
<b>T7</b>	0,0350	0,4684	0,0717	0,0030*	0,2939	0,0609	-	-
<b>T8</b>	0,0000*	0,0006*	0,0000*	0,3361	0,0001*	0,0519	0,0008*	-
<b>Média</b>	110,28 ± 11, 12	264,47 ± 61,31	140,84 ± 28, 26	786,19 ± 39,54	187,03 ± 17, 49	462,25 ± 55,69	238,28 ± 43,22	1128,10 ± 147,75
<b>Qui-quadrado</b>	48,85							
<b>Graus de liberdade</b>	7							
<b>p-valor</b>	< 0,01							

**Tabela 5** - Parâmetro de OB/lagarta de SfMNPV conforme a especificação de dieta para alimentação e desenvolvimento larval (T1 a T8) de *Spodoptera frugiperda*.

	OB/lagarta							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<b>T2</b>	0,0393	-	-	-	-	-	-	-
<b>T3</b>	0,2773	0,1214	-	-	-	-	-	-
<b>T4</b>	0,0000*	0,0020*	0,0000*	-	-	-	-	-
<b>T5</b>	0,0987	0,3192	0,2425	0,0004*	-	-	-	-
<b>T6</b>	0,0003*	0,0493	0,0024*	0,1109	0,0169*	-	-	-
<b>T7</b>	0,0329	0,4679	0,1059	0,0026*	0,2910	0,0581	-	-
<b>T8</b>	0,0000*	0,0005*	0,0000*	0,3337	0,0001*	0,0493	0,0006*	-
<b>Média</b>	3,02 <sup>E+09</sup>	1,81 <sup>E+09</sup>	3,12 <sup>E+09</sup>	3,89 <sup>E+08</sup>	1,71 <sup>E+09</sup>	7,25 <sup>E+08</sup>	2,46 <sup>E+09</sup>	3,13 <sup>E+08</sup>
<b>Qui-quadrado</b>	48,07							
<b>Graus de liberdade</b>	7							
<b>p-valor</b>	< 0,01							

\*Valores p-valor diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de comparação múltipla (teste de Dunn).

**Tabela 6** - Parâmetros de produção em escala média de OB de SfMNPV conforme as condições de incubação (C1, C2 e C3).

<b>Parâmetros de produção em escala média de OB</b>			
<b>Dietas</b>	<b>OB/recipiente (x10<sup>11</sup>)<sup>1</sup></b>	<b>OB/g (x10<sup>9</sup>)</b>	<b>g/recipiente</b>
<b>C1</b>	1,23 ± 0,31 a	6,45 ± 1,33 a	20,06 ± 2,91 b
<b>C2</b>	1,50 ± 0,30 a	4,80 ± 0,58 a	30,12 ± 2,13 a
<b>C3</b>	1,94 ± 0,35 a	7,31 ± 1,26 a	26,30 ± 1,23 ab
<b>CV (%)</b>	45,74	40,17	19,32
<b>p-valor</b>	0,310	0,305	0,022

<sup>1</sup>Médias seguidas por uma mesma letra na coluna não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Tabela 7** - Parâmetros de produção em escala média de OB de SfMNPV na condição de incubação C2 com dieta padrão (D2) e dieta a base de gérmen de trigo (D7) (capítulo 1).

<b>Parâmetros de produção em escala média de OB</b>			
<b>Dietas</b>	<b>OB/recipiente (x10<sup>10</sup>)<sup>1</sup></b>	<b>OB/g (x10<sup>9</sup>)</b>	<b>g/recipiente</b>
<b>D2</b>	8,60 ± 01,60 a	2,86 ± 0,43 a	29,78 ± 2,42 a
<b>D7</b>	7,18 ± 2,05 a	2,49 ± 0,64 a	29,05 ± 2,54 a
<b>CV (%)</b>	52,13	45,72	18,83
<b>p-valor</b>	0,601	0,652	0,84

<sup>1</sup>Médias seguidas por uma mesma letra na coluna não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle biológico é um excelente método de manejo de pragas e para que os produtos sejam ofertados de maneira competitiva no mercado, tem-se aumentado os esforços em pesquisas que viabilizem os processos produtivos. Portanto, é fundamental fortalecer as parcerias entre as instituições de pesquisa e aquelas cujo se beneficiaram com as soluções propostas a partir da pesquisa base, tanto para apontamento de problemas, como para propor soluções. De fato, os avanços serão proveitosos e concretos à medida que informações forem discutidas e analisadas. É impossível pensar em melhorias no sistema de produção *in vivo* de baculovírus sem parceria e fomento à pesquisa.

Esclarecimentos fisiológicos que governam o comportamento canibal em lagartas de *Spodoptera frugiperda* podem ser a chave para desencadear estudos para minimizar os efeitos decorrentes desse hábito em nível de multiplicação massal. O comportamento canibal manifestado por *S. frugiperda* nem sempre foi alvo de investigações. Explicações sob fatores e condições que propiciam o canibalismo ainda podem ser mais investigadas. Diante disso, como observado nessa pesquisa, regular as condições de temperatura e disponibilidade de alimento torna-se uma possibilidade importante de ajuste para minimizar esse comportamento.

Outra preocupação que vem sendo apontada na literatura e que precisa ser superada para produzir baculovírus efetivamente *in vivo*, é a otimização da dieta usada para inocular o vírus e garantir uma boa taxa de crescimento das larvas, bem como uma dieta que possibilite a inoculação do vírus sem preocupações com a inativação térmica, e que proporcione uma inoculação homogênea do lote de lagartas e conseqüentemente garantir uma maior uniformidade na infecção viral. Os resultados obtidos nesse estudo possibilitam um direcionamento para melhorias no sistema de inoculação viral *in vivo*. Observou-se que a proteína de soja texturizada pode ser utilizada para a inoculação de SfMNPV e que a dieta artificial de composição simplificada a base de gérmen de trigo, pode ser empregada para complementar a alimentação após a infecção viral das lagartas inoculadas em grupo de 300 indivíduos. Porém, ressalta-se que mesmo sendo mais econômica, a dieta a base de gérmen de trigo, não se assemelhou a dieta artificial usualmente utilizada.



Ainda podemos avançar em muitos estudos envolvendo o comportamento canibal do hospedeiro, como por exemplo, em investigações hormonais que regulam o mesmo. Além disso os resultados obtidos nessa pesquisa envolvendo a seleção de dieta para inoculação viral direcionam as futuras investigações de pesquisa para dietas que sejam mais ricas em carboidratos, por exemplo, para obter sucesso na produção viral. Considero importante esse direcionamento futuro, pois além de algumas respostas apontadas na tese, percebe-se o quanto ainda podemos avançar e progredir na pesquisa que envolve as adaptações do sistema de produção *in vivo*.