

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Utilização de microescleródios do fungo *Metarhizium rileyi* (Hypocreales:  
Clavicipitaceae) para controle de *Spodoptera frugiperda* (SMITH, 1797)  
(Lepidoptera: Noctuidae)**

**Isabela Fetter**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba  
2024**

**Isabela Fetter**  
**Licenciada em Ciências Biológicas**

**Utilização de microescleródios do fungo *Metarhizium rileyi* (Hypocreales:  
Clavicipitaceae) para controle de *Spodoptera frugiperda* (SMITH, 1797) (Lepidoptera:  
Noctuidae)**

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Prof. Dr. **ITALO DELALIBERA JÚNIOR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba**  
**2024**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**  
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Fetter, Isabela

Utilização de microescleródios do fungo *Metarhizium rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) para controle de *Spodoptera frugiperda* (SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) / Isabela Fetter - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2024.

85 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Fermentação líquida submersa 2. Fungo entomopatogênico 3. Lagarta-do-cartucho-do-milho 4. Controle biológico I. Título

Aos meus pais, Maisa Angelica Mocelin Fetter e Marcos Fetter, pela educação, apoio, confiança, amor e todos os esforços para que eu conseguisse chegar até aqui.

Ao meu irmão Eduardo Mocelin Fetter, pela amizade e companheirismo.  
À minha avó Élide Tochetto Mocelin (*in memoriam*), pela educação e amor incondicional.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP) e ao Departamento de Entomologia e Acarologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa, indispensável durante o período de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ítalo Delalibera Júnior, pela oportunidade, orientação e confiança na condução do trabalho.

À Dra. Camila Costa Moreira, pela inestimável colaboração na construção e desenvolvimento do projeto, bem como pelo apoio moral e pela amizade.

Ao Dr. Gabriel Moura Mascarin, pela contribuição no desenvolvimento do projeto, análise estatística, pelo apoio moral e intelectual.

À Dra. Janaina Brandão Seibert, por não medir esforços no auxílio para o desenvolvimento do projeto, pelo apoio moral e pela amizade.

Ao corpo docente do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, por todo conhecimento compartilhado.

À equipe da Koppert – Piracicaba: Isabella, Camila, Natália, Lara, Nicole, Kenia, Bruna, Patrícia, Gabriela, Tiago e Deivid, por toda colaboração, suporte, espaço, material, cafés e risadas.

À equipe do SparcBio: Janaina, Vitor, Letícia, Larissa, Aline, Lucila e Marta, pelo auxílio e suporte na condução e avaliação de bioensaios.

Aos meus amigos da pós-graduação e do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, que compartilhamos cafés, risadas, lágrimas, frustrações e felicidade: Thais, Aline, Carla, Nyeppson, Eliane, Daniela, Isabella, Willian, Maria Júlia, Laryssa, Jean, Eric, Solange, Letícia, Jonathan, Inaê e Maria Clara.

Aos meus amigos e fiéis escudeiros: Gustavo, Rafaela, Heloiza, Rejayne, Giovana, Karen, Bruna, Lara, Ana Luisa, Tiago, Renata, Thayna e Karol, perto ou longe, sempre presentes.

À todos da minha família pelo apoio, motivação, carinho e contribuição.

**Muito Obrigada!**

“Let everything happen to you: beauty and  
terror. Just keep going. No feeling is final.”

Rainer Maria Rilke

## SUMÁRIO

	RESUMO.....	9
	ABSTRACT.....	10
1	INTRODUÇÃO.....	11
	Referências.....	12
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	Importância e danos da lagarta-do-cartucho-do-milho <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae).....	15
2.2	Bioecologia da espécie.....	16
2.3	Fungos entomopatogênicos.....	18
2.4	<i>Metarhizium (Nomuraea) rileyi</i> Kepler, S.A. Rehner & Humber.....	19
2.5	Estudo e utilização de novos propágulos.....	21
	Referências.....	23
3	PRODUÇÃO E ESCALONAMENTO DE MICROESCLERÓDIOS DE <i>Metarhizium rileyi</i> (Hypocreales: Clavicipitaceae) E GERMINAÇÃO EM DIFERENTES SUPERFÍCIES PARA O CONTROLE DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).....	31
	Resumo.....	31
	PRODUCTION AND SCALING UP OF <i>Metarhizium rileyi</i> (Hypocreales: Clavicipitaceae) MICROSCLEROTIA AND GERMINATION IN DIFFERENT SURFACES TO CONTROL <i>Spodoptera frugiperda</i> (SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).....	31
	Abstract.....	31
3.1	Introdução.....	32
3.2	Materiais e Métodos.....	33
3.2.1	Produção de microescleródios em meios de cultura com diferentes razões de carbono e nitrogênios (C:N).....	33
3.2.2.	Produção de microescleródios em biorreator de bancada.....	35
3.2.3	Desenvolvimento de formulações com microescleródios de <i>M. rileyi</i> .....	36
3.2.4	Avaliação da germinação e esporulação das formulações.....	37
3.2.5	Avaliação da germinação dos microescleródios em diferentes superfícies....	38
3.2.5.1	Avaliação da germinação no solo.....	38

3.2.5.2	Avaliação da germinação em soja e milho .....	38
3.2.6	Vida de prateleira.....	40
3.2.7	Análise estatística.....	40
3.3	Resultados.....	41
3.3.1	Produção de microescleródios em meios de cultura com diferentes razões de carbono e nitrogênio (C:N).....	41
3.3.2	Produção de microescleródios em biorreator de bancada.....	45
3.3.3	Avaliação de formulações para otimização da germinação e esporulação de microescleródios de <i>M. rileyi</i> e vida de prateleira.....	47
3.3.4	Germinação dos microescleródios em diferentes superfícies: solo, folhas e ágar-água.....	49
3.4	Discussão.....	52
	Referências.....	58
4	EFICIÊNCIA DE MICROESCLERÓDIOS DE <i>Metarhizium rileyi</i> (HYPOCREALES: CLAVICIPITACEAE) NO MANEJO DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM DIFERENTES HABITATS.....	65
	Resumo.....	65
	EFFICIENCY OF <i>Metarhizium rileyi</i> (HYPOCREALES: CLAVICIPITACEAE) MICROSCLEROTIA TO CONTROL <i>Spodoptera frugiperda</i> (SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) IN DIFFERENT HABITATS.....	65
	Abstract.....	65
4.1	Introdução.....	66
4.2	Materiais e Métodos.....	67
4.2.1	Criação de <i>Spodoptera frugiperda</i> em laboratório.....	67
4.2.2	Bioensaios de laboratório.....	68
4.2.2.1	Ação de microescleródios de <i>M. rileyi</i> em <i>S. frugiperda</i> sobre folhas de milho.....	68
4.2.2.2	Ação de microescleródios de <i>M. rileyi</i> em <i>S. frugiperda</i> sobre o solo.....	70
4.2.3	Ação de microescleródios de <i>M. rileyi</i> em <i>S. frugiperda</i> em casa de vegetação.....	71
4.2.4	Análise estatística.....	72



4.3	Resultados.....	73
4.3.1	Ação de microescleródios de <i>M. rileyi</i> em <i>S. frugiperda</i> sobre folhas de milho.....	73
4.3.2	Ação de microescleródios de <i>M. rileyi</i> em <i>S. frugiperda</i> sobre o solo em laboratório.....	74
4.3.3	Ação de microescleródios de <i>M. rileyi</i> em <i>S. frugiperda</i> em casa de vegetação.....	75
4.4	Discussão.....	78
	Referências.....	82

## RESUMO

### **Utilização de microescleródios do fungo *Metarhizium rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) para controle de *Spodoptera frugiperda* (SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**

Microescleródios (MS) são agregados de hifas melanizados que possuem reserva nutricional endógena e podem ser produzidos através da fermentação líquida em alguns fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium rileyi*. Este fungo é conhecido pela sua alta virulência a lepidópteros da família Noctuidae, causando epizootias naturais e sendo um fungo promissor para controle de importantes pragas, como *Spodoptera frugiperda*. O objetivo deste projeto foi avaliar a possibilidade de produção de MS de *M. rileyi* para o isolado ESALQ5611, através da seleção de um meio de cultura e escalonamento para biorreator de bancada, seguido do teste de virulência desse propágulo para o controle de *S. frugiperda* em diferentes habitats do seu ciclo de vida: folhas, solo e cartucho, em bioensaios de laboratório e casa de vegetação. Meios de cultura com relação carbono e nitrogênio menores (10:1 e 12:1) produziram mais de  $10^4$  MS/mL, sendo estatisticamente melhores que os meios com razões elevadas (30:1 e 50:1). MS de *M. rileyi* granulados sobre folhas de milho (94,9%) e soja (92,7%) germinaram e esporularam mais rápido do que sobre ágar-água (29,3%) após 24 horas. A aplicação da mistura contendo  $1 \times 10^5$  MS/g foi altamente eficiente em laboratório, alcançando uma média de 44,4% de mortalidade de lagartas (L3) em três dias e 95% de mortalidade total ao final do experimento (10 dias), sendo estatisticamente melhor que a pulverização de conídios aéreos ( $1 \times 10^7$  conídios/mL). Os MS também tiveram ótimo desempenho sobre o solo, com germinação de 69% em 72 horas e mortalidade total de 85% em dez dias para lagartas de 5º ínstar. A umidade em casa de vegetação foi provavelmente um fator limitante no desenvolvimento desse propágulo, pois os índices de germinação dos MS foram muito baixos ( $4\% \pm 3,19\%$ ), bem como a taxa de mortalidade das lagartas ( $20 \pm 20,9\%$  para MS aplicados preventivamente e  $11,6 \pm 11,7\%$  para MS aplicados no dia do posicionamento da lagarta na planta). Contudo, a elevada virulência em condições de laboratório e a estabilidade no armazenamento mesmo após 6 meses coloca a estratégia do uso de MS como promissora. Contudo, existe a necessidade de mais estudos para desenvolvimento de formulações que possam favorecer a germinação para aplicações em campo.

Palavras-chave: Fermentação líquida submersa, Fungo entomopatogênico, Lagarta-do-cartucho-do-milho, Controle biológico

## ABSTRACT

### **Use of *Metarhizium rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) microsclerotia to control *Spodoptera frugiperda* (SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**

Microsclerotia (MS) are described as aggregates of melanized hyphae that possess endogenous nutritional reserves and can be produced through liquid fermentation in some entomopathogenic fungi, such as *Metarhizium rileyi*. This fungus is commonly known for its high virulence against the Lepidoptera (Noctuidae) group, causing natural epizootics and being a very promising fungus for the control of important pests, such as *Spodoptera frugiperda*. The goal of this project was to evaluate the possibility of producing MS of *M. rileyi* for the isolate ESALQ5611, through the selection of a culture media and scaling up to benchtop bioreactor, followed by testing the strategy of this propagule for the control of *S. frugiperda* in different contexts of its life cycle: leaves, soil, and whorl, through laboratory and greenhouse bioassays. Culture media with lower carbon-to-nitrogen ratios (10:1 and 12:1) produced more than  $10^4$  microsclerotia  $\text{mL}^{-1}$ , statistically better than media with higher ratios (30:1 and 50:1). It was also observed that *M. rileyi* MS germinated and produced conidia faster on maize and soybean leaves than on water agar (maize 94,9%, soybean 92,7% and water agar 29,3% of germination after 24 hours). The application of the formulation containing  $1 \times 10^5$  MS/g was highly effective in laboratory, reaching an average mortality of 44,4% in three days and 95% total mortality at the end of the experiment (10 days), statistically better than conidial spraying. MS also had good results in soil, with a 69% germination rate in 72 hours and 85% mortality in ten days. The moisture in the greenhouse were probably a limiting factor in the performance of this propagule because the germination rates in the greenhouse were very low ( $4\% \pm 3,19\%$ ), as well as the mortality rate of caterpillars ( $20\% \pm 20,9$  to MS application previously and  $11,6\% \pm 11,7$  to MS applied in the day which the caterpillars were transferred to the plants). Therefore, the high virulence in laboratory and stability within six months of storage shows a promising strategy. Although, the technology requires further studies to develop formulations that can promote germination to field applications.

**Keywords:** Submerged liquid fermentation, Entomopathogenic fungus, Fall armyworm, Biological control

## 1. INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é atualmente considerada a principal praga-chave da cultura, causando danos em todos os estágios fenológicos da planta e podendo levar a planta a morte (GRÜTZMACHER, et al., 2000; VALICENTE, 2015). Além do seu hábito alimentar voraz e polífago, o problema de desenvolvimento de resistência em *S. frugiperda* também é evidente, com muitas populações já resistentes às principais tecnologias de controle do mercado, como sementes geneticamente modificadas (tecnologia *bt*) (FARIAS et al., 2014; BURTET et al., 2017; FATORETTO et al., 2017) e aos principais grupos de moléculas químicas (DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001; NASCIMENTO et al., 2016; GARLET et al., 2021). Além disso, este inseto passa maior parte da fase de lagarta dentro do cartucho do milho, protegendo-o de aplicações de controladores (seja químicos ou biológicos) na forma de pulverização.

*Metarhizium (Nomuraea) rileyi* Kepler, S.A. Rehner & Humber é um fungo entomopatogênico que apresenta alta virulência e especificidade ao clado Lepidoptera (Noctuidae), o que inclui inúmeras pragas de grande importância para o agronegócio (MOSCARDI; SOSA-GÓMEZ, 1993; ALVES, 1998; COSTA et al., 2015; FRONZA et al., 2017), entre elas, *S. frugiperda*. Este microrganismo também possui grande capacidade de causar epizootias e é conhecido pela sua ocorrência natural em várias lagartas de importância econômica, como *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens* (ALLEN et al., 1971; ALVES, 1998; FRONZA et al., 2017).

Apesar da alta virulência de *M. rileyi* a Noctuídeos, existem poucos bioprodutos à base deste fungo no mundo, devido a suas altas exigências nutricionais e ambientais, além de um perfil genômico ainda pouco explorado (QIN et al., 2009; THAKRE et al., 2011). Pensando nisso, seria de grande importância a exploração de novos propágulos através da fermentação líquida para *M. rileyi*. Song et al. (2013) produziram microescleródios deste fungo e apontaram como uma alternativa a ser estudada para criação de bioprodutos. Microescleródios são enovelados de hifas que apresentam reserva nutricional endógena e produzem melanina, garantindo maior proteção e persistência no campo em condições adversas (JACKSON; JARONSKI, 2009; VILLAMIZAR et al., 2018), podendo ser produzidos para alguns fungos entomopatogênicos através da fermentação líquida submersa. Quando em microclimas favoráveis, estas estruturas germinam projetando hifas e posteriormente produzindo conídios aéreos, que são propágulos infectivos para os insetos.

Pensando na alta virulência de *M. rileyi* a lagartas, somada a dificuldade na produção de conídios aéreos e o hábito de *S. frugiperda* de permanecer dentro do cartucho (um microclima com alta umidade), o presente trabalho teve como objetivo avaliar a utilização de microescleródios de *M. rileyi* isolado ESALQ 5611 no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho em diferentes habitats do seu ciclo-de-vida: folhas, cartucho e solo. O isolado selecionado já teve sua alta virulência à lagarta demonstrada em estudos anteriores (GOTTI et al., 2023). Foi avaliada a possibilidade de produção de MS deste isolado, bem como escalonamento em biorreator. Em seguida, foram realizados testes com lagartas em laboratório e casa de vegetação, com intuito de verificar a ação deste propágulo para *S. frugiperda*.

## Referências

- ALLEN, G. E.; GREENE, G. L.; WHITCOMB, W. H. An epizootic of *Spicaria rileyi* on the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in Florida. **The Florida Entomologist**, v. 54, n. 2, p. 189–191, 1971.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, p. 21 - 37, 1998.
- BURTET, L. M.; BERNARDI, O.; MELO, A. A.; PES, M. P.; STRAHL, T. T.; GUEDES, J. V.C. Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in south Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n. 12, p. 2569-2577, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.4660>
- COSTA, V. H. D.; SOARES, M. A.; RODRÍGUEZ, F. A. D.; ZANUNCIO, J. C.; SILVA, I. M.; VALICENTE, F. H. *Nomuraea rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 98, n. 2, p. 796–798, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1653/024.098.0263>
- DIEZ-RODRÍGUES, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 311 – 316, 2001. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2001000200016>
- FARIAS, J. R.; ANDOW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; SORGATTO, R. J.; FRESIA, P.; SANTOS, A. C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance do Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p. 150 – 158, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.019>
- FATORETTO, J. C.; MICHEL, A. P.; FILHO, M. C. S.; SILVA, N. Adaptive potential of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) limits Bt trait durability in Brazil. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 8, n. 1, p. 1 – 10, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1093/jipm/pmx011>
- GARLET, C. G.; GUBIANI, P. S.; PALHARINI, R. B.; MOREIRA, R. P. GODOY, D. N.; FARIAS, J. R.; BERNARDI, O. Field-evolved resistance to chlorpyrifos by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Inheritance mode, cross-resistance patterns, and synergism. **Pest Management Science**, v. 77, p. 5367 – 5374, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.6576>

- GOTTI, I. A.; MOREIRA, C. C.; DELALIBERA Jr., I.; LICHT, H. H. D. Blastospores from *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium rileyi* are not always as virulent as conidia are towards *Spodoptera frugiperda* caterpillars and use different infection mechanisms. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1594, 2023. Doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061594>
- GRÜTZMACHER, A. D.; MARTINS, J. F. S.; CUNHA, U. S. Insetos pragas das culturas do milho e sorgo no agroecossistema de várzea. *In*: PARFITT, J. M. B. **Produção de milho e sorgo na várzea**. Pelotas: Embrapa de Clima Temperado, 2000. p. 87-101.
- JACKSON, M. A.; JARONSKI, S. T. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological research*, v. 113, n. 8, p. 842 – 850, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.03.004>
- MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D. R. A Case Study in Biological Control: Soybean Defoliating Caterpillars in Brazil. **International Crop Science**, p. 115 – 119, 1993. <https://doi.org/10.2135/1993.internationalcropscience.c20>
- NASCIMENTO, A. R. B.; FARIAS, J. R.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R. J.; OMOTO, C. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. *Pest Management Science*, v. 72, n. 4, p. 810 – 815, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.4057>
- QIN, L.; LIU, X.; LI, J.; CHEN, H.; YAO, Q.; YANG, Z.; CHEN, K. Protein profile of *Nomuraea rileyi* spore isolated from infected silkworm. **Current Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 578–585, 2009. doi:10.1007/s00284-009-9374-2
- SONG, Z.; YIN, Y.; JIANG, S.; LIU, J.; CHEN, H.; WANG, Z. Comparative transcriptome analysis of microsclerotia development in *Nomuraea rileyi*. **BMC genomics**, v. 14, n. 411, p. 1- 9, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-411>
- THAKRE, M.; THAKUR, M.; MALIK, N.; GANGER, S. Mass scale cultivation of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* using agricultural products and agro wastes. **Journal of Biopesticides**, v. 4, n. 4, p. 176 – 179, 2011.
- VALICENTE, F. H. **Manejo integrado de pragas na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2015.
- VILLAMIZAR, L. F.; NELSON, T. L.; JONES, S. A.; JACKSON, T. A.; HURST, M. R. H.; MARSHALL, S. D. G. Formation of microsclerotia in three species of *Beauveria* and storage stability of a prototype granular formulation. **Biocontrol, Science and Technology**, v. 28, n. 12, p. 1097-1113, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1514584>



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Importância e danos da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta-do-cartucho-do-milho, é a principal praga do milho nas Américas, podendo reduzir a produção em aproximadamente 34 a 52% (VALICENTE, 2015; MONTEZANO, 2018). Trata-se de um inseto polífago, ou seja, que pode se alimentar de inúmeros outros cultivos. Montezano *et al.* (2018) apontaram 356 espécies de plantas pertencentes a 76 famílias como possíveis hospedeiras para a lagarta. No Brasil, este inseto também causa sérios danos à soja e algodão (BARROS *et al.*, 2010 a, b), contudo os maiores prejuízos se concentram na cultura do milho (SARMENTO, 2002), sendo um grande problema tendo em vista que o país está no ranking dos maiores produtores de milho do mundo. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), no ano safra 2022/23 o Brasil produziu um valor estimado de 125.062,4 milhões de toneladas de milho, totalizando uma área de aproximadamente 22.316,3 milhões de hectares plantados. Neste contexto, a lagarta-do-cartucho-do-milho é um grande problema para os produtores, devido aos grandes danos e perdas econômicas que este inseto causa à produção, afetando a economia do país e a segurança alimentar.



**Figura 1.** Danos causados por *S. frugiperda* em plantas de milho no campo (A e B) e mariposa na folha de milho (C).

Fonte: próprio autor.

Além disso, *S. frugiperda* é um inseto cosmopolita, ou seja, amplamente distribuído pelo mundo. Além de sua grande dispersão no continente americano, este inseto vem sendo encontrado em inúmeros outros países do globo, como em quase todo o continente africano



(GOERGEN et al., 2016), Índia (SHARANABASAPPA KALLESHWARASWAMY et al., 2018), Indonésia (SARTIAMI et al., 2020), China (WANG et al., 2020) e inúmeros outros países da Ásia (BALOCH et al., 2020) e Oceania (PIGGOTT et al., 2020, QI et al., 2021). Recentemente, a espécie tem sido reportada na Europa, porém de forma mais restrita (BABENDREIER et al., 2022). No Brasil, a sua ocorrência é ampla, sendo reportada em todo território nacional (SARMENTO et al., 2002; BUSATO et al., 2004; MIRANDA, 2006; RICHARDT et al., 2020; NEGRINI, 2019). Trabalhos de modelagem computacional tem apontado a influência de mudanças climáticas e ocupação de terra na futura distribuição e ocorrência de *S. frugiperda* pelo mundo. Neste sentido, as mudanças climáticas podem alterar o padrão de distribuição do inseto, contudo, a forma de utilização do território é o fator que mais influencia na distribuição espacial de *S. frugiperda*, sendo que culturas anuais e pastagens são os principais nichos responsáveis pelo aumento na distribuição da praga (Early et al., 2018; Liu et al., 2020).

*Spodoptera frugiperda* possui todos os atributos de uma praga-chave de grande importância, como alta fecundidade, distribuição cosmopolita, hábito polífago e alimentação em todos os estágios fenológicos de desenvolvimento da planta (ÁVILA et al., 1997; MONTEZANO et al., 2018). Além disso, são reportadas populações resistentes às principais classes de inseticidas, como piretroides e organofosforados (YU, 1991; DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001; CARVALHO, 2013; GARLET et al., 2021), benzoilureias (NASCIMENTO et al., 2016) e também altas chances de evolução de resistência a espinosinas (OKUMA et al., 2017; LIRA et al., 2020) e diamidas (BOLZAN et al., 2019). Vários trabalhos também apontam desenvolvimento de resistência a variedades geneticamente modificadas de milho (FARIAS et al., 2014; MONNERAT et al., 2015; BURTET et al., 2017; FATORETTO et al., 2017). Isso ocorre principalmente devido ao manejo inadequado com aplicação contínua de defensivos químicos e falta de monitoramento, falta de implementação de áreas de refúgio em lavouras com variedades transgênicas e alta fecundidade e plasticidade genética de *S. frugiperda*, tornando o controle desta praga continuamente mais desafiador (CRESPO et al., 2021).

## **2.2. Bioecologia da espécie *Spodoptera frugiperda***

*Spodoptera frugiperda* possui o desenvolvimento holometabólico, ou seja, compreende os estádios de ovo, lagarta, pupa e adulto e o seu ciclo de vida tem duração de

aproximadamente 30 dias, podendo variar com as condições de temperatura e umidade ambiente (SPARKS, 1979; CRESPO et al., 2021).

A postura dos ovos é realizada comumente à noite, e estes são depositados nas folhas do milho, sendo em média 100 a 200 ovos por postura, que eclodem em um período de três a cinco dias. A duração média do período larval se dá entre treze a quinze dias compreendendo de cinco a sete ínstar, variando com as condições de temperatura, umidade, sexo e disponibilidade de alimento (ROSA; BARCELOS, 2012; VALICENTE, 2015; CRESPO et al., 2021). No último ínstar larval, a lagarta dirige-se ao solo, onde permanece sem se alimentar. Esse período é denominado de estágio pré-pupa e a duração pode variar de um a três dias. O estágio seguinte de pupa tem duração de oito a dez dias. Após o período pupal, ocorre a emergência do adulto, com longevidade de aproximadamente dez dias (CRUZ, 1995; VALICENTE, 2015).

As fêmeas colocam massas de ovos que comumente apresentam uma camada de escamas, provenientes do seu abdômen. Logo após a eclosão, as larvas apresentam a cabeça preta e o corpo esbranquiçado, escurecendo após três dias. No último ínstar, a lagarta apresenta o dorso com coloração marrom-acinzentado, linhas evidentes na região dorsal e subdorsal e uma marcação em formato de Y invertido na cabeça (CRUZ, 1995; ÁVILA et al., 1997; ROSA; BARCELOS, 2012). Os adultos, possuem aproximadamente 35 mm de envergadura e 15 mm de comprimento, coloração acinzentada sendo as asas posteriores de coloração clara e as asas anteriores de coloração pardo-escura. As mariposas apresentam dimorfismo sexual, diferenciadas no macho pela presença de manchas claras evidentes (CRUZ, 1995; ÁVILA et al., 1997).

Quanto ao seu comportamento na planta do milho, no primeiro ínstar de desenvolvimento, ocorre a raspagem das folhas do milho. A partir do segundo e terceiro ínstar, as lagartas perfuram as folhas e então se direcionam para a região do cartucho, onde passam maior parte do seu ciclo imaturo e causam grandes danos ao cultivo, podendo levar as plantas à morte (ROSA; BARCELOS, 2012). Logo após a eclosão, podem ser encontradas mais de uma lagarta por cartucho, porém devido ao seu comportamento canibal, com o desenvolvimento do inseto é comum encontrar apenas uma lagarta por cartucho (ÁVILA, 1997; ROSA; BARCELOS, 2012). Após o seu desenvolvimento alimentando-se da planta de milho, a lagarta dirige-se ao solo para a fase de pupa (SPARKS, 1979; VALICENTE, 2015).

Esse hábito de viver dentro do cartucho durante maior parte do seu ciclo de vida dificulta o acesso para o controle dessa praga (FARIA et al., 2021). Pensando nisso, a busca por diferentes metodologias de controle é essencial para *S. frugiperda*, e sabendo da sua alta

tendência ao desenvolvimento de resistência, métodos de controle biológico como o controle microbiano através de fungos, são os principais candidatos para o manejo desse inseto.

### **2.3. Fungos entomopatogênicos**

Sabendo-se do impacto deste inseto na produção agrícola e a dificuldade no seu controle, é necessário o estudo de métodos de controle além dos defensivos químicos, que possam otimizar o manejo e associar novas ferramentas de controle para a lagarta-do-cartucho-do-milho.

A utilização de fungos entomopatogênicos como agentes de controle de insetos praga é amplamente descrita na literatura há muitos anos, sendo o primeiro trabalho publicado sobre controle de insetos com fungos datando de 1878-79 (ALVES, 1998b). Estes microrganismos são agentes muito estudados e utilizados no mundo todo, sua grande aplicabilidade se dá especialmente pelo amplo espectro de ação, capacidade de infecção por contato (diferentemente de vírus e bactérias que necessitam de ingestão) e patogenicidade às diferentes fases de desenvolvimento dos insetos (ALVES, 1998a; VALADARES-INGLIS et al., 2020).

O Brasil é uma grande referência em controle biológico com fungos, sendo o programa de utilização do fungo *Metarhizium anisopliae* para o controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar (Hemiptera: Cercopidae) conhecido mundialmente (ALVES, 1998a; LI et al., 2010). Além disso, vem sendo registrados inúmeros produtos de base biológica nos últimos anos no país. Entre os anos 2022 e 2023, aproximadamente 100 novos produtos biológicos foram registrados, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Apesar dos fungos serem estudados há muito tempo, a necessidade de constante pesquisa é essencial para o avanço do mercado de bioprodutos, com obstáculos a serem superados como a otimização da persistência em campo, tempo de prateleira, produção e exploração de novos propágulos e prospecção de novas espécies ou cepas que possam ser utilizadas no controle microbiano, principalmente no Brasil, um país com tamanha biodiversidade e clima favorável à utilização de microrganismos.

#### 2.4. *Metarhizium (Nomuraea) rileyi* Kepler, S.A. Rehner & Humber

*Metarhizium (Nomuraea) rileyi* Kepler, S.A. Rehner & Humber é um fungo entomopatogênico classificado dentro do filo Ascomycota, ordem Hypocreales e família Clavicipitaceae (KEPLER et al., 2014). Durante muito tempo, este microrganismo foi classificado na literatura como *Nomuraea rileyi*, contudo através de estudos moleculares desenvolvidos por Kepler et al. (2014), passou a ser classificado como *Metarhizium rileyi* (Farl.) Kepler, S.A. Rehner & Humber.

É um fungo dimórfico, ou seja, possui um estágio morfológico inicial leveduriforme seguido de uma fase hifal/micelial (PENDLAND; BOUCIAS, 1997; ALVES, 1998a). Apresenta distribuição cosmopolita, podendo ser isolado a partir de insetos, artrópodes e solo pelo mundo todo (HUMBER et al., 2011). É um agente de controle natural, e seu grande destaque é para a ordem Lepidoptera, especialmente a família Noctuidae, sendo 90% de seus hospedeiros pertencentes a este grupo, o que é muito relevante tendo em vista o grande impacto econômico dos insetos desse clado na agricultura (MOSCARDI; SOSA-GÓMEZ, 1993; ALVES, 1998; FRONZA et al., 2017).

Este microrganismo possui grande capacidade de causar epizootias e sua eficiência no controle natural de lagartas da soja como *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens*, e também no algodão como em *Helicoverpa armigera*, é amplamente conhecida pelos produtores (ALLEN et al., 1971; ALVES, 1998a; COSTA et al., 2015; FRONZA et al., 2017). Em revisão feita por Fronza et al. (2017) foram apontadas 60 espécies de lepidópteros suscetíveis a *M. rileyi* em todo o mundo, sendo muitas dessas espécies de importância econômica. No Brasil, segundo o catálogo de isolados de fungos entomopatogênicos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa – Soja), a maioria dos isolados de *M. rileyi* é proveniente de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* (SOSA-GÓMEZ; SILVA, 2002). Alguns trabalhos apontam que a grande capacidade epizoótica de *M. rileyi* pode ocorrer por lagartas mumificadas no solo como fonte de inóculo, citadas como escleródios, que mesmo após longos períodos entre safras, sob condições favoráveis de temperatura e umidade, o fungo é capaz de germinar e esporular, produzindo conídios infectivos (SPRENKEL; BROOKS, 1977; THORVILSON et al., 1985).

Além disso, existem inúmeros estudos sobre a capacidade endofítica do gênero *Metarhizium* spp., mostrando sua forte interação com o solo e plantas. Cotes et al. (2020) mostraram a capacidade de *M. brunneum* em alterar fisiologicamente plantas de *Brassica oleracea* gerando respostas comportamentais na mosca-da-couve *Delia radicum* L. (Diptera:

Anthomyiidae), reduzindo sua oviposição. Zheng et al. (2023) mostraram a capacidade endofítica de inúmeros fungos entomopatogênicos em tomate para estimular o crescimento e controle da população da traça do tomateiro *Phthorimaea absoluta* (*Tuta absoluta*), entre eles *M. rileyi*, *M. flavoviride* e *M. anisopliae* apresentaram resultados satisfatórios. Meirelles et al. (2013) também estudaram a capacidade endofítica de *M. rileyi*, e constataram que o fungo aumentou a biomassa e estimulou a produção de metabólitos secundários em *Hypericum polyanthemum*.

Alguns trabalhos também apontaram a capacidade de associação de *M. rileyi* a inseticidas químicos, *in vitro* e no campo, objetivando uma estratégia de Manejo Integrado de Pragas (MIP), onde seria possível otimizar o controle da praga alvo além de reduzir as chances de desenvolvimento de resistência pelos insetos (AMBETHGAR, 2009). A biocompatibilidade de *M. rileyi in vitro* com alguns defensivos como thiamethoxan (BATISTA et al., 2001), chlorantraniliprole, azoxystrobin (MATCHA et al., 2021) e imidacloprid (COSTA et al., 2018) já foi verificada. Outra estratégia a ser explorada é a associação de microrganismos, em que experimentos com *M. rileyi*, baculovírus *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) e baculovírus *Chrysodeixis includens* (ChinNPV) obtiveram resultados de campo satisfatórios para aplicação associada destes microrganismos (Lopes et al., 2020).

Contudo, apesar da sua alta virulência para lagartas e alta capacidade epizoótica, ainda existem poucos produtos de *M. rileyi* no mercado brasileiro e mundial comparado a outras espécies de fungos entomopatogênicos, devido a dificuldade em encontrar isolados que possuam estabilidade genética e menores exigências nutricionais e ambientais para sua produção massal de conídios aéreos (DEVI et al., 2001; EDELSTEIN et al., 2004; SUWANNAKUT et al., 2005; THAKRE et al., 2011; SONG et al., 2013). No Brasil, Faria et al (2021) alcançaram uma produção de aproximadamente  $1,3 \times 10^9$  conídios por grama de arroz utilizando inóculo de pré-cultura utilizando o isolado CG381 de *M. rileyi*. Outro ponto a ser destacado em *M. rileyi*, é o fato de blastosporos serem produzidos com facilidade através da fermentação líquida, porém apresentam menor virulência quando comparados a conídios aéreos, diferentemente de outros fungos (RIBA; GLANDARD, 1980; CORRÊA, 2020; GOTTI et al., 2023).

Sabendo-se da produção de vários propágulos diferentes por um mesmo microrganismos, é evidente a necessidade de exploração de novos propágulos e diferentes métodos de produção massal, procurando tornar *M. rileyi* um microrganismos mais presente no mercado de biológicos, tendo em vista seu grande potencial.

## 2.5. Estudo e utilização de novos propágulos

A principal forma de produção de fungos entomopatogênicos é através da fermentação sólida estática em substratos como meios de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) ou arroz, onde são obtidos conídios aéreos (ALVES; FARIA, 2010; MASCARIN et al., 2018). Outra forma de produção é a fermentação líquida submersa para obtenção de blastoporos, conídios submersos e microescleródios, porém é utilizada com menor frequência (MASCARIN et al., 2018).

Tendo em vista a constante evolução no mercado de produtos biológicos, estudos vêm sendo realizados para a produção e desenvolvimento de metodologias de produção mais econômicas e eficientes e aplicação de novos propágulos. Microescleródios são estruturas de resistência que consistem em agregados de hifas que produzem pigmento fotoprotetor (melanina) ao longo do seu desenvolvimento, o que os protege da radiação UV e elevadas temperaturas (ZHONG et al., 2008; JACKSON; JARONSKI, 2009; SONG et al., 2013; VILLAMIZAR et al., 2018). Além disso, essas estruturas possuem reservas nutricionais endógenas e permanecem em estado de quiescência ou dormência sob condições ambientais desfavoráveis, sendo assim capazes de tolerar a dessecação. Quando submetidos a condições adequadas de umidade, germinam e produzem conídios aéreos, que quando entram em contato com o artrópode alvo, dão início ao processo de infecção (JACKSON; JARONSKI, 2009; SONG et al., 2013; SONG, 2018).

Os microescleródios são comumente produzidos por fungos fitopatogênicos, contudo inúmeros trabalhos apontam a indução desse propágulo através da fermentação líquida de vários fungos entomopatogênicos (EVANS; SAMSON, 1982; JACKSON; JARONSKI, 2009; JACKSON; JARONSKI, 2012; MASCARIN et al., 2014; SONG et al., 2013; VILLAMIZAR et al., 2018). Além da vantagem quanto a resistência às condições ambientais, aumentando assim a permanência do inóculo no campo, a produção de microescleródios é obtida através de fermentação líquida, o que acarreta economia de tempo e maior controle do ambiente. Nesse sentido, há redução das chances de contaminação, resultando em uma produção com menos gastos e em menor tempo comparada à produção de conídios aéreos em arroz (JACKSON; JARONSKI, 2009; LIRA et al., 2020). Além disso, sua resistência à dessecação pode proporcionar uma elevada vida de prateleira (JACKSON; JARONSKI, 2012; YOUSEF-YOUSEF et al., 2022). Jaronski e Jackson (2008) também apontam que apenas uma unidade de grânulo de microescleródio pode vir a produzir uma quantidade letal de conídios para um inseto.

Contudo, apesar das inúmeras vantagens, também existem as desvantagens e desafios a serem trabalhados e superados. Os microescleródios não são propágulos infectivos, precisam de condições de umidade favoráveis para germinarem e produzirem os conídios infectivos, sendo assim, só serão capazes de contaminar o inseto-alvo quando submetidos às condições favoráveis de umidade para germinação e esporulação (JARONSKI, 2014). Outro ponto seria devido ao grande tamanho, maior que conídios e blastosporos, inviabilizando a pulverização com uso de calda e sendo necessário estudos de tecnologia de aplicação e estratégias de utilização.

Song et al. (2013) estudaram a obtenção de microescleródios de *M. rileyi* em laboratório e obtiveram resultados satisfatórios, sendo realizada otimização de meio de cultura e teste de virulência em lagartas de *Etiella zinckenella* (SONG et al., 2014). Estudos moleculares e de produção em biorreator também foram realizados, levando a ótimos resultados e mostrando que microescleródios de *M. rileyi* poderiam ser estudados como uma alternativa promissora para a produção e comercialização desse fungo (LIU et al., 2014; SONG et al., 2014; SONG et al., 2017). Contudo, trabalhos de utilização deste propágulo ainda são escassos na literatura, sendo necessário maiores estudos sobre uma estratégia de utilização em semi-campo e campo.

Tendo em vista o grande potencial de epizootias e virulência de *M. rileyi* principalmente para a família Noctuidae, este trabalho visa investigar o desempenho em laboratório e casa de vegetação de microescleródios deste fungo, com o intuito de proporcionar mais uma alternativa de manejo para *S. frugiperda*. A hipótese inicial parte da ideia de que o microambiente do cartucho do milho, pela sua arquitetura, retenção de água e ponto de orvalho, apresente as condições de umidade, temperatura e baixa incidência UV necessárias para o microescleródio produzir conídios infectivos. Considerando que *S. frugiperda* passa a maior parte da sua fase de lagarta dentro do cartucho, o contato seria facilitado levando a infecção e morte das lagartas, seguido da esporulação, o que garante a continuidade do inóculo no campo.

Para isso, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos, em que no primeiro foram apresentados experimentos das etapas de produção, formulação e avaliação da germinação dos microescleródios em diferentes superfícies. Já no segundo capítulo, foram apresentados bioensaios com avaliações de estratégias de utilização de microescleródios para controle de *S. frugiperda*, em diferentes contextos do ciclo de vida da lagarta: nas folhas, no cartucho e no solo.

## Referências

- AGROFIT [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 30 de jul. de 2023.
- ALLEN, G. E.; GREENE, G. L.; WHITCOMB, W. H. An epizootic of *Spicaria rileyi* on the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in Florida. **The Florida Entomologist**, v. 54, n. 2, p. 189–191, 1971.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, p. 21 - 37, 1998a.
- ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, p. 21 - 37, 1998b
- ALVES, R. T.; FARIA, M. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos**. 1ª ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010.
- AMBETHGAR, V. Potential of entomopathogenic fungi in insecticide resistance management (IRM): A review. **Journal of Biopesticides**, v.2, n.2, p. 177–193, 2009.
- ÁVILA, C. J.; DEGRANDE, P. E.; GOMEZ, S.A. Insetos pragas: reconhecimento, comportamento, danos e controle. In: **Milho: informações técnicas**. Dourados: EMBRAPA-CPAO, 1997. p.157- 170 (EMBRAPA-CPAO: Circular técnica, 5)
- BABENDREIER, D.; TOEPFER, S.; BATEMAN, M.; KENIS, M. Potential management options for the invasive moth *Spodoptera frugiperda* in Europe. **Journal of Economic Entomology**, v. 115, p. 1772 – 1782, 2022.
- BALOCH, M. N.; FAN, J.; HASEEB, M.; ZHANG, R. Mapping potential distribution of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Central Asia. **Insects**, v. 11, p. 1 – 10, 2020. Doi: <https://doi.org/10.3390/insects11030172>
- BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; RUBERSON, J. R.; OLIVEIRA, M. D. Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 137, p. 237 – 245, 2010 a. Doi: 10.1111/j.1570-7458.2010.01058.x
- 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, p. 996 – 1001, 2010 b. Doi:<https://doi.org/10.1590/S1519-566X2010000600023>
- BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; LAMAS, C. Effect of thiamethoxan on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical Entomology**, v. 30, n.3, p.437–44, 2001. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2001000300017>
- BOLZAN, A.; PADOVEZ, F. E. O.; NASCIMENTO, A. R. B.; KAISER, I. S.; LIRA, E. C., AMARAL, F. S. A.; KANNO, R. H.; MALAQUIAS, J. B.; OMOTO, C. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest Management Science**, v. 75, p. 2682 – 2689, 2019. Doi:10.1002/ps.5376
- BURTET, L. M.; BERNARDI, O.; MELO, A. A.; PES, M. P.; STRAHL, T. T.; GUEDES, J. V.C. Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in south Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n. 12, p. 2569-2577, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.4660>



- BUSATO, G. R.; GRUTZMACHER, A. C. O.; VIEIRA, E. A.; ZIMMER, P. D.; KOPP, M. M.; BANDEIRA, J. M.; MAGALHÃES, T. R. Análise da Estrutura e Diversidade Molecular de Populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Associadas às Culturas de Milho e Arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 709 – 716, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2004000600008>
- CARVALHO, R. A.; OMOTO, C.; FIELD, L. M.; WILLIAMSON, M. S.; BASS, C. Investigating the Molecular Mechanisms of Organophosphate and Pyrethroid Resistance in the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. **Plos One**, v. 8, n. 4, p. 1 – 11, 2013. Doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062268>
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) – **Acompanhamento da safra brasileira 2022/23**. Disponível em: [file:///C:/Users/isabe/Downloads/E-book\\_BoletimZdeZSafrasZ-Z4oZlevantamento.pdf](file:///C:/Users/isabe/Downloads/E-book_BoletimZdeZSafrasZ-Z4oZlevantamento.pdf) Acesso em: 05 de Junho de 2023.
- CORRÊA, B. Development of drying methods and evaluation of blastospores efficacy of *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* and *Metarhizium rileyi* against *Euschistus heros* and *Spodoptera* spp. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Entomologia) – Universidade de São Paulo / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2020
- COSTA, V. H. D.; SOARES, M. A.; RODRÍGUEZ, F. A. D.; ZANUNCIO, J. C.; SILVA, I. M.; VALICENTE, F. H. *Nomurea rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 98, n. 2, p. 796–798, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1653/024.098.0263>
- COSTA, M. A.; LOUREIRO, E. S.; PESSOA, L. G. A.; DIAS, P. M. Compatibilidade de inseticidas utilizados na cultura do eucalipto com *Metarhizium rileyi* (Farlow) (= *Nomurea rileyi*). **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 5, n. 3, p.44-48, 2018. Doi: <https://doi.org/10.32404/rean.v5i3.2149>
- COTES, B.; THOMING, G.; AMAYA-GÓMEZ, C. V.; NÓVAK, I.; NANSEN, C. Root-associated entomopathogenic fungi manipulate host plants to attract herbivorous insects. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020. Doi: [10.1038/s41598-020-80123-5](https://doi.org/10.1038/s41598-020-80123-5)
- CRESPO, A. M.; GONÇALVES, D. C.; SOUZA, M. N.; JUNIOR, J. S. Z.; COSTA, H.; FAVARATO, L. F.; RANGEL, O. J. P.; ARAÚJO, J. B. S. **Manejo da lagarta-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*): panorama geral das atualizações no controle alternativo**. Alegre: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, 2021.
- CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 45p., 1995.
- DEVI, P. S. V.; CHOWDARY, A.; PRASAD, Y. G. Cost-effective multiplication of the entomopathogenic fungus *Nomurea rileyi* (F) Samson. **Mycopathologia**, v. 151, p. 35 – 39, 2001. Doi:[10.1023/a:1010953319092](https://doi.org/10.1023/a:1010953319092)
- DIEZ-RODRÍGUES, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 311 – 316, 2001. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2001000200016>
- EARLY, R.; GONZÁLEZ-MORENO, P.; MURPHY, S. T.; DAY, R. Forecasting the global extent of invasion of the cereal pest *Spodoptera frugiperda*, the fall armyworm. **NeoBiota**, v. 40, p. 25 – 50, 2018.

- EDELSTEIN, J. D.; LECUONA, R. E.; TRUMPER, E. V. Selection of culture media and in vitro assessment of temperature-dependent development of *Nomuraea rileyi*. **Biological Control**, v. 33, n. 6, p. 737 – 742, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2004000600011>
- EVANS, H. C.; SAMSON, R.A. *Cordyceps* species and their anamorphs pathogenic on ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems I. The *Cephalotes* (Myrmicinae) complex. **Transactions of the British Mycological Society**, v.79, p. 431–453, 1982.
- FARIA, M.; SOUZA, D. A.; SANCHES, M. M.; SCHMIDT, F. G. V.; OLIVEIRA, C. M.; BENITO, N. P.; LOPES, R. B. Evaluation of key parameters for developing a *Metarhizium rileyi*-based biopesticide against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize: Laboratory, greenhouse and field trials. **Pest Management Science**, v. 78, p. 1146 – 1154, 2021.
- FATORETTO, J. C.; MICHEL, A. P.; FILHO, M. C. S.; SILVA, N. Adaptive potential of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) limits Bt trait durability in Brazil. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 8, n. 1, p. 1 – 10, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1093/jipm/pmx011>
- FRONZA, E.; SPECHT, A.; HEINZEN, H.; BARROS, N. M. *Metarhizium (Nomuraea) rileyi* as biological control agent. **Biocontrol, Science and Technology**, v. 27, n. 11, p. 1243 – 1264, 2017. Doi: [10.1080/09583157.2017.1391175](https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1391175)
- GARLET, C. G.; GUBIANI, P. S.; PALHARINI, R. B.; MOREIRA, R. P. GODOY, D. N.; FARIAS, J. R.; BERNARNI, O. Field-evolved resistance to chlorpyrifos by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Inheritance mode, cross-resistance patterns, and synergism. **Pest Management Science**, v. 77, p. 5367 – 5374, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.6576>
- GOERGEN, G.; KUMAR, P. L.; SANKUNG, S. B.; TOGOLA, A.; TAMÓ, M. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in west and central Africa. **Plos One**, v. 11, n. 10, p. 1 – 9, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165632>
- GOTTI, I. A.; MOREIRA, C. C.; DELALIBERA Jr., I.; LICHT, H. H. D. Blastospores from *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium rileyi* are not always as virulent as conidia are towards *Spodoptera frugiperda* caterpillars and use different infection mechanisms. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1594, 2023. Doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061594>
- GRÜTZMACHER, A. D.; MARTINS, J. F. S.; CUNHA, U. S. Insetos pragas das culturas do milho e sorgo no agroecossistema de várzea. In: PARFITT, J. M. B. **Produção de milho e sorgo na várzea**. Pelotas: Embrapa de Clima Temperado, 2000. p. 87-101.
- HUMBER, R. A.; HANSEN, K. S.; WHEELER, M. M. Catalog of species. New York: ARSef ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, 2011.
- JACKSON, M. A.; JARONSKI, S. T. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. **Mycological research**, v. 113, n. 8, p. 842 – 850, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.03.004>
- JACKSON, M. A.; JARONSKI, S. T. Development of pilot-scale fermentation and stabilisation processes for the production of microsclerotia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* strain F52. **Biocontrol, Science and Technology**, v. 22, n. 8, p. 915 – 930, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.696578>

- JARONSKI, S. T. Mass production of entomopathogenic fungi: state of the art. In: MORALES-RAMOS, J. A.; ROJAS, M. G.; SHAPIRO-ILAN, D. J. (Ed), **Mass Production of Beneficial Organisms**. Elsevier inc., p. 357 – 415, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822106-8.00017-8>
- KEPLER, R. M.; HUMBER, R. A.; BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. **Mycologia**, v. 106, n. 4, p. 811 – 829, 2014. Doi: <https://doi.org/10.3852/13-319>
- LI, Z.; ALVES, S. B.; ROBERTS, D. W.; FAN, M.; DELALIBERA JR., ITALO; TANG, J.; LOPES, R. B.; FARIA, M.; RANGEL, D. E. N. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their success using entomopathogenic fungi. **Biocontrol, Science and Technology**, v. 20, n. 2, p. 117 – 136, 2010.
- LIRA, A. C.; MASCARIN, G.M.; DELALIBERA Jr., I. Microsclerotia production for dual role as plant biostimulant and control of *Spodoptera frugiperda* through corn seed coating. **Fungal Biology**, v. 124, p. 689-699, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.03.011>
- LIU, J.; YIN, Y.; SONG, Z.; LI, Y.; JIANG, S.; SHAO, C.; WANG, Z. NADH: flavin oxidoreductase/NADH oxidase and ROS regulate microsclerotium development in *Nomuraea rileyi*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p.1927 – 1935, 2014.
- LIU, T.; WANG, J.; HU, X.; FENG, J. Land-use change drives present and future distributions of Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Science of the Total Environment**, v. 706, n. 1, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135872>
- LOPES, R. B.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; OLIVEIRA, C. M.; SANCHES, M. M.; SOUZA, D. A.; BENITO, N. P.; SCHMIDT, F. G. V.; FARIA, M. Efficacy of an oil-based formulation combining *Metarhizium rileyi* and nucleopolyhedroviruses against lepidopteran pests of soybean. **Journal of Applied Entomology**, v. 144, n. 8, p.678 - 689, 2020. Doi: 10.1111/jen.12787
- MASCARIN, G. M.; LOPES, R. B.; DELALIBERA, I. Jr., FERNANDES, E. K. K.; LUZ, C.; FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 165, p. 46 – 53, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.001>
- MASCARIN, G. M.; KOBORI, N. N.; JESUS VITAL, R. C.; JACKSON, M. A.; QUINTELA, E.D. Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.30, p.1583-1590, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1581-0>
- MATCHA, N.; DURAIMURUGAN, P.; BHOWMICK, A. K. Effect of insecticides and fungicides on growth and sporulation of *Metarhizium rileyi* (Farlow) Samson. **The Farma Innovation Journal**, v. 10, n. 7, p. 1444 – 1447, 2021.
- MEIRELLES, G.; PINHATTI, A. V.; SOSA-GOMEZ, D.; ROSA, L. M. G.; RECH, S. B.; POSER, G. L. V. Influence of fungal elicitation with *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson in the metabolism of acclimatized plants of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Guttiferae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 112, p. 379 – 385, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0234-6>
- MIRANDA, J. E. **Distribuição Vertical de Lagartas de *Spodoptera frugiperda* no Algodoeiro**. Campina Grande: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006

- MONNERAT, R.; MARTINS, E.; MACEDO, C.; QUEIROZ, P.; PRAÇA, L.; SOARES, C. M.; MOREIRA, H.; GRISI, I.; SILVA, J.; SOBERON, M.; BRAVO, A. Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. **Plos One**, v. 10, p. 1–12, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119544>
- 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, 286 – 300, 2018. Doi: <https://doi.org/10.4001/003.026.0286>
- MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D. R. A Case Study in Biological Control: Soybean Defoliating Caterpillars in Brazil. **International Crop Science**, p. 115 – 119, 1993. <https://doi.org/10.2135/1993.internationalcropscience.c20>
- NASCIMENTO, A. R. B.; FARIAS, J. R.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R. J.; OMOTO, C. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. **Pest Management Science**, v. 72, n. 4, p. 810 – 815, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.4057>
- NEGRINI, M. Dinâmica populacional e manejo de pragas nas culturas de arroz, milho e soja no cerrado de Roraima. Tese de doutorado (Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) – Universidade Federal de Roraima, 2019.
- OKUMA, D. A.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, O.; SILVA, A. P.; OMOTO, C. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science**, v. 74, p. 1441 – 1448, 2017. Doi:10.1002/ps.4829
- PENDLAND, J. C.; BOUCIAS, D. G. In vitro growth of the entomopathogenic hyphomycete *Nomureae rileyi*. **Mycologia**, v. 89, n. 1, p. 66 – 71, 1997.
- PIGGOTT, M. P.; TADLE, F. P.; PATEL, S.; GOMEZ, K. C.; THISTLETON, B. Corn-strain or rice-strain? Detection of fall-armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera:Noctuidae), in northern Australia. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 41, p. 2607 – 2615, 2021. Doi:10.1007/s42690-021-00441-7
- QI, G.; MA, J.; WAN, J.; REN, Y.; MCKIRDY, S.; HU, G.; ZHANG, Z. Source Regions of the First Immigration of Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Invading Australia. **Insects**, v. 12, p. 1104 – 1115, 2021. Doi: <https://doi.org/10.3390/insects12121104>
- RIBA, G.; GLANDARD, A. Mise au point d'unmilieu nutritif pour la culture profonde duchampignon entomopathogène *Nomuraea rileyi*. **Entomophaga**, Paris, v. 25, n. 3, p. 317 – 322, 1980.
- RICHARDT, F. S.; MICHELI, A.; TASIOR, D.; RUTHES, E; FOERSTER, L. A. Strains of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Noctuidae) in the states of Paraná and São Paulo, Brazil. **EntomoBrasilis**, v. 13, p. 854, 2020. Doi: <http://orcid.org/0000-0002-5235-0614>
- ROSA, A. P. S. A.; BARCELOS, H. T. **Bioecologia e controle de *Spodoptera frugiperda* em milho**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2012.
- SARMENTO, R. A.; AGUIAR, R. W. S.; AGUIAR, R. A. S. S.; VIEIRA, S. M. J.; OLIVEIRA, H. G.; HOLTZ, A. M. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 2, p. 41-48, 2002.

- SARTIAMI, D.; DADANG; HARAHAP, I. S.; KUSUMAH, Y. M.; ANWAR, R. First record of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in Indonesia and its occurrence in three provinces. **Earth and Environmental Sciences**, v. 468, p. 1 – 8, 2020. Doi: 10.1088/1755-1315/468/1/012021
- SHARANABASAPPA, KALLESHWARASWAMY, C. M.; ASOKAN, R.; SWAMY, H. M.; MARUTHI, M. S.; PAVITHRA, H. B.; GOERGEN, G. First report of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), an alien invasive pest on maize in India. **Pest Management in Horticultural Ecosystems**, v. 24, n. 1, p. 23-29, 2018. Doi:<https://orcid.org/0000-0003-4496-0495>
- SONG, F. Fungal microsclerotia development: essential prerequisites, influencing factors, and molecular mechanism. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 9873–9880, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9400-z>
- SONG, Z.; YIN, Y.; JIANG, S.; LIU, J.; CHEN, H.; WANG, Z. Comparative transcriptome analysis of microsclerotia development in *Nomuraea rileyi*. **BMC genomics**, v. 14, n. 411, p. 1- 9, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-411>
- SONG, Z.; YIN, Y.; JIANG, S.; LIU, J.; WANG, Z. Optimization of culture medium for microsclerotia production by *Nomuraea rileyi* and analysis of their viability for use as mycoinsecticide. **Biocontrol**, v. 59, n. 5, p. 597-605, 2014. Doi: 10.1007/s10526-014-9589-4
- SONG, Z.; LIN, Y.; DU, F.; YIN, Y.; WANG, Z. Statistical optimization of process variables and large-scale production of *Metarhizium rileyi* (Ascomycetes: Hypocreales) microsclerotia in submerged fermentation. **Mycology**, v. 8, n. 1, p. 39-47, 2017. Doi: 10.1080/21501203.2017.1279688
- SOSA-GOMEZ, D. R.; SILVA J. J. **Fungos entomopatogênicos**: catálogo de isolados. Londrina: Embrapa Soja, 2002.
- SPARKS, A. N. A Review of the Biology of the Fall Armyworm. **The Florida Entomologist**, v. 62, n. 2, p. 82-87, 1979. Doi: <https://doi.org/10.2307/3494083>
- SUWANNAKUT, S.; BOUCIAS, D. C.; WIWAT, C. Genotypic analysis of *Nomureae rileyi* collected from various noctuid hosts. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 90, n. 3, p. 169 – 176, 2005.
- THAKRE, M.; THAKUR, M.; MALIK, N.; GANGER, S. Mass scale cultivation of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* using agricultural products and agro wastes. **Journal of Biopesticides**, v. 4, n. 4, p. 176 – 179, 2011.
- THORVILSON, H. G.; LEWIS, L. C.; PEDIGO, L. P. Overwintering Potential of *Nomuraea rileyi* (Fungi: Deuteromycotina) from *Plathypena scabra* (Lepidoptera: Noctuidae) Cadavers in Central Iowa. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 58, n. 4, p. 662-667, 1985.
- VALADARES-INGLIS, M. C.; LOPES, R. B.; FARIA, M. R. Controle de artrópodes-praga com fungos entomopatogênicos. In: FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Controle Biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020.
- VALICENTE, F. H. **Manejo integrado de pragas na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2015.
- VILLAMIZAR, L. F.; NELSON, T. L.; JONES, S. A.; JACKSON, T. A.; HURST, M. R. H.; MARSHALL, S. D. G. Formation of microsclerotia in three species of *Beauveria* and storage stability of a prototype granular formulation. **Biocontrol, Science and Technology**, v. 28, n. 12, p. 1097-1113, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1514584>

- WANG, R.; JIANG, C.; GUO, X.; CHEN, D.; YOU, C.; ZHANG, Y.; WANG, M.; LI, Q. Potential distribution of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) in China and the major factor influencing distribution. **Global, Ecology and Conservation**, v. 21, p. 1 – 10, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00865>
- YOUSEF-YOUSEF, M.; ROMERO-CONDE, A.; QUESADA-MORAGA, E.; GARRIDO-JURADO, I. Production of microsclerotia by *Metarhizium* sp., and factors affecting their survival, germination, and conidial yield. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 4, p. 402, 2022. Doi: <https://doi.org/10.3390/jof8040402>
- YU, S. J. Insecticide Resistance in the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 39, n. 1, p. 84 – 91, 1991. Doi: [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(91\)90216-9](https://doi.org/10.1016/0048-3575(91)90216-9)
- ZHENG, Y.; LIU, Y.; ZHANG, J.; LIU, X.; JU, Z.; SHI, H.; MENDOZA-MENDOZA, A.; ZHOU, W. Dual role of endophytic entomopathogenic fungi: induce plant growth and control tomato leafminer *Phthorimaea absoluta*. **Pest Management Science**, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.7657>
- ZHONG, J.; FRASES, S.; WANG, H.; CASADEVALL, A.; STARK, R. E. Following fungal melanin biosynthesis with solid-state NMR: biopolymer molecular structures and possible connections to cell-wall polysaccharides. **Biochemistry**, v. 47, n. 16, p. 4701 – 4710, 2008. Doi: [10.1021/bi702093r](https://doi.org/10.1021/bi702093r)



### 3 PRODUÇÃO E ESCALONAMENTO DE MICROESCLERÓDIOS DE *Metarhizium rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) E GERMINAÇÃO EM DIFERENTES SUPERFÍCIES PARA O CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda* (SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

#### Resumo

O fungo *Metarhizium rileyi* é conhecido pela sua capacidade de causar epizootias naturais em lepidópteros, entre eles a lagarta-do-cartucho-do-milho (*Spodoptera frugiperda*). O presente trabalho teve como objetivo a exploração do propágulo microescleródio (MS), produzido através da fermentação líquida, para controle de *S. frugiperda*. Para isso, foi avaliada a possibilidade de produção de MS do isolado de *M. rileyi* ESALQ5611 em shaker, selecionando uma razão C:N ideal para produção, seguido do escalonamento para biorreator de bancada (4 L). Foram avaliadas também diferentes formulações em microclimas com diferentes umidades relativas (40%, 70%, 80% e 100%) e o desempenho dos MS sobre diferentes superfícies, como folhas expandidas, solo, ágar-água e cartucho. Foi constatado que razões C:N menores (10:1 e 12:1) produziram até 10 vezes mais MS ( $10^4$  MS/mL) do que as razões maiores (30:1 e 50:1) e também estruturas mais homogêneas em tamanho ( $1,6 \times 10^4 \pm 1,97 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  e  $1,8 \times 10^4 \pm 3,1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ , para as razões 10:1 e 12:1, respectivamente), contudo as razões mais altas produziram propágulos mais melanizados. Quanto ao escalonamento em biorreator, observou-se que a alta rotação e aeração foram parâmetros essenciais na produção desse propágulo. Além disso, a quantidade de inóculo também foi um critério avaliado, obtendo-se dez vezes mais propágulos quando utilizado 10% de pré-cultura como inóculo ( $10^4$  MS/mL) em relação a 5%. A umidade relativa (UR) mostrou-se um fator limitante no desenvolvimento dos MS, sendo observada germinação e esporulação somente em microclimas com UR% próxima a 100%, e isto provavelmente tenha sido responsável pela germinação quase nula em casa de vegetação. Outro ponto de destaque foi que os MS germinaram e esporularam mais rápido sobre a superfície de folhas de milho (94,9%) e soja (92,7%) do que sobre o ágar-água (29,3%) em 24 horas, e produziram estatisticamente mais conídios sobre a folha de milho ( $1,38 \times 10^9$  con/mL) do que sobre a soja ( $9,13 \times 10^8$  con/mL) em seis dias de incubação. Além disso, foi observado que em 6 meses de armazenamento de microescleródios em geladeira (aproximadamente 5 °C) e freezer (aproximadamente -20 °C), a germinação e produção de conídios pelos MS permaneceu inalterada. Estes dados indicam a viabilidade da utilização desses propágulos no campo, pois mesmo com a elevada umidade proporcionada pelo ágar-água, os MS se desenvolveram melhor sobre a superfície de plantas.

**Palavras-chave:** Fermentação líquida; biorreator; Fungos entomopatogênicos;

**PRODUCTION AND SCALING UP OF *Metarhizium rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) MICROSCLEROTIA AND GERMINATION IN DIFFERENT SURFACES TO CONTROL *Spodoptera frugiperda* (SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**

#### Abstract

The fungus *Metarhizium rileyi* is widely known for its ability to induce natural epizootics in lepidopterans, especially the Noctuidae family, including *Spodoptera*



*frugiperda*, the fall armyworm. The present study aimed to explore a propagule named microsclerotia through liquid fermentation, to control *S. frugiperda*. The initial goal was to assess the capability of producing microsclerotia of the *M. rileyi* isolate ESALQ5611 in a shaker, selecting an ideal C:N ratio for production, followed by scaling up to benchtop bioreactor (4L). Different formulations were also evaluated in microclimates with varying relative humidities (40%, 70%, 80%, and 100%), and the germination and sporulation of the propagules on different surfaces, such as, leaves, soil, water-agar, and the maize whorl. Lower C:N ratios (10:1 and 12:1) produced up to 10 times more microsclerotia ( $10^4$  MS/mL) than higher ratios (30:1 and 50:1), as well as more homogenous structures in size ( $1,6 \times 10^4 \pm 1,97 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  and  $1,8 \times 10^4 \pm 3,1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ , respectively), however, media with higher C:N ratios led to greater melanization. In the bioreactor scaling-up process, high rotation and aeration were essential parameters in microsclerotia formation, as well as the quantity of inoculum used, reaching ten times more MS when used 10% pre-culture inoculum ( $10^4$  MS/mL) than with 5%. Relative humidity proved to be a limiting factor for germination and sporulation in microsclerotia, achieved only in microclimates with RH% near 100%. Another observed aspect was that microsclerotia germinated and produced conidia faster on leaf surfaces than on water-agar (maize 94,9%, soybean 92,7%, and water agar 29,3% of germination in 24 hours). It also statistically produced more conidia on maize leaves than on soybean leaves in six days of incubation ( $1,38 \times 10^9$  and  $9,13 \times 10^8$ , respectively). It was also observed that the germination and production of conidia rates remain unchanged within six months of storage in the fridge (approximately 5 °C) and freezer (approximately – 20 °C). It is an exciting result because the goal is to use the propagules in the field, and the MS germinates and sporulates better on the plant surfaces than on water-agar, a theoretically great environment.

**Keywords:** Liquid fermentation; Bioreactor; Entomopathogenic fungi.

### 3.1 Introdução

Microrganismos entomopatogênicos são de imensurável biodiversidade e podem apresentar uma série de diferentes propágulos produzidos por uma mesma espécie. Atualmente, com objetivo de desenvolvimento e comercialização de bioprodutos microbianos, a fermentação líquida tem ganhado grande destaque devido à qualidade do produto final, facilidade de escalonamento e redução no tempo de produção (JARONSKI, 2014; MASCARIN et al., 2019). Além disso, o fato de ter um maior controle das condições físico-químicas de cultivo (variações em meios de cultura, pH, rotação, aeração, etc.) permite a exploração de diferentes propágulos submersos e maior controle das condições de cultivo (JARONSKI, 2014; MASCARIN et al., 2019).

*Metarhizium (Nomuraea) rileyi* é um fungo entomopatogênico pertencente ao filo Ascomycota, ordem Hypocreales e família Clavicipitaceae (KEPLER et al., 2014). Este apresenta alta virulência e especificidade ao clado Lepidoptera (Noctuidae), o que inclui inúmeras pragas de grande importância para o agronegócio (MOSCARDI; SOSA-GÓMEZ, 1993; ALVES, 1998; COSTA et al., 2015; FRONZA et al., 2017), entre elas, a lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Este

inseto é um grande problema há anos em várias culturas, principalmente no milho, e se disseminou rapidamente pelo mundo nos últimos anos. Apesar de ser um excelente controlador natural de *S. frugiperda* e outros noctuídeos, existe dificuldade em encontrar isolados com uma menor instabilidade genética e capazes de produzirem conídios aéreos sem a necessidade de altas exigências nutricionais e de condições ambientais específicas (THAKRE et al., 2011; FRONZA et al., 2017)

Pensando nesse aspecto, seria de grande notoriedade a exploração de novos propágulos através da fermentação líquida para *M. rileyi*. Song et al. (2013) produziram microescleródios deste fungo e apontaram como uma alternativa a ser estudada para a geração de bioprodutos. Microescleródios são estruturas de resistência produzidas naturalmente por certos fungos fitopatogênicos, mas que podem ser induzidas em alguns fungos entomopatogênicos através da fermentação líquida em laboratório. Trata-se de enovelados de hifas que apresentam reserva nutricional endógena e produzem melanina, garantindo maior proteção e persistência no campo em condições adversas (JACKSON; JARONSKI, 2009; VILLAMIZAR et al., 2018). Quando em microclimas favoráveis, estas estruturas germinam projetando hifas e posteriormente produzindo conídios aéreos, que são propágulos infectivos para os insetos. Sendo assim, o microescleródio não é a estrutura infectiva em si, porém pode produzir grande quantidade de conídios para infectar os insetos-alvo. Jackson e Jaronski (2009) apontam que em certas situações, apenas uma unidade de microescleródio pode produzir quantidade suficiente de conídios para matar um inseto.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a produção de microescleródios pelo isolado ESALQ 5611 de *M. rileyi*, utilizado em estudos anteriores e que obteve alta virulência para *S. frugiperda* mesmo em baixas concentrações ou em ínstares finais de desenvolvimento da lagarta (GOTTI et al., 2023). Com a finalidade de otimizar a produção e o desempenho de microescleródios deste isolado, foram testados meios com diferentes razões C:N, escalonamento para biorreator de bancada, teste de formulações e germinação em diferentes superfícies, com o intuito de futuramente, este propágulo vir a ser uma alternativa para o manejo da lagarta-do-cartucho-do-milho *S. frugiperda*.

## **3.2 Materiais e Métodos**

### **3.2.1 Produção de microescleródios em meios de cultura com diferentes razões de carbono e nitrogênio (C:N)**

O isolado utilizado para todos os bioensaios foi ESALQ 5611 de *M. rileyi* da Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Prof. Sérgio Batista Alves” do Laboratório

de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da Esalq – USP, Piracicaba – SP. O isolado foi selecionado previamente em estudos para virulência em *S. frugiperda* (GOTTI et al., 2023).

Os conídios de *M. rileyi* foram obtidos em meio sólido SMAY (10 g/L de neopeptona, 40 g/L de maltose, 2,0 g/L de extrato de levedura, 15 g/L de ágar) (KISH; ALLEN, 1978; BOUCIAS; PENDLAND, 1984) e as placas incubadas por até 10 dias sob condições controladas ( $26 \pm 2$  °C;  $70 \pm 10\%$  UR; 12 h de fotofase). Suspensão de conídios ( $5 \times 10^7$  conídios/mL) foi utilizado como inóculo para obtenção de microescleródios. O meio de cultura líquido consistiu em um meio basal contendo 2,0 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4 g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 37 mg/L de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,05 g/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 16 mg/L de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 14 mg/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e enriquecido com extrato de levedura e fonte de carbono, que variaram dependendo da razão C:N que se objetivou avaliar (10:1, 12:1, 30:1 e 50:1) (Tabela 1). O pH inicial foi ajustado para 6, não sendo controlado durante a fermentação. Foram utilizados 54 mL de meio de cultura e 6 mL de inóculo contendo  $5 \times 10^7$  conídios/mL em cada frasco do tipo “*baffled flasks*” de 250 mL ( $28 \pm 2$  °C; 300 rpm).

**Tabela 1.** Concentrações de carbono e nitrogênio total nos meios de cultura avaliados para produção de microescleródios de *M. rileyi*.

<b>Razão C:N</b>	<b>Carbono total (g/L)</b>	<b>Nitrogênio total (g/L)</b>
<b>10:1</b>	36,06	3,6
<b>12:1</b>	56,1	4,5
<b>30:1</b>	36,2	1,2
<b>50:1</b>	35,9	0,72

O experimento foi repetido três vezes no tempo com três repetições para cada tratamento, cada frasco considerado uma repetição (N = 9). Diariamente durante seis dias, uma alíquota de 1 mL foi retirada de cada frasco sob condições assépticas e avaliada quanto à produção de microescleródios. Para isso, 100  $\mu\text{L}$  do caldo fermentado foi aplicado em lâmina coberta com lamínula (24 x 60 mm) e a superfície inteira foi contabilizada, sendo considerado microescleródio somente estruturas melanizadas maiores que 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro (JACKSON; JARONSKI, 2009). No último dia de avaliação (144 horas de fermentação), as estruturas foram analisadas quanto a sua morfologia através da medição de área utilizando o software Leica Application Suite (LAS) versão 4.1.0 (2012). A maioria das estruturas formadas apresentou formato oval (elipse), portanto a morfologia foi avaliada através da área da elipse em  $\mu\text{m}^2$ . No último dia também foi avaliada a biomassa seca por mL das produções, sendo

retirado duas amostras de 1 mL de cada frasco e filtrado em funil de Buchner sobre Kitassato acoplado a uma bomba de vácuo. Utilizou-se papel filtro previamente pesado e após processo de filtragem, o material foi submetido a secagem durante 48h em estufa de secagem. Após a secagem do material, foi aferido o peso da biomassa seca de cada repetição.

Quanto à análise da taxa de germinação dos microescleródios e a produção de conídios, foram aplicados 100 µL de suspensão de microescleródios frescos contendo  $10^3$  microescleródio/mL em placas de Petri contendo ágar-água (2 %) e incubadas em condições controladas ( $26 \pm 2$  °C, UR  $70 \pm 10\%$  e 12 h de fotofase). Após 24 horas de incubação, a taxa de microescleródios germinados (sendo considerados microescleródios germinados estruturas melanizadas com projeções de hifas, independente do tamanho) foi contabilizada em estereomicroscópio. Para análise da produção de conídios pelos microescleródios, estas mesmas placas continuaram incubadas durante 7 dias. Após esse período, 10 mL de solução Tween 80 (0,05%) foram adicionados às placas e os conídios raspados. O líquido foi recoletado com o auxílio de uma pipeta e por meio de diluições, foi realizada a contagem da quantidade de conídios por placa de Petri em câmara de Neubauer (Jackson e Jaronski, 2009; Lira et al., 2020).

### 3.2.2 Produção de microscleródios em biorreator de bancada

O meio que apresentou melhor desempenho para produção de microescleródios em frascos na primeira etapa (meio com razão C:N 12:1) foi utilizado para escalonamento em biorreator. O equipamento utilizado foi o Minifors 2 (Infors HT<sup>®</sup>), que possui capacidade de 6 litros, sendo produzidos sempre em 3 litros de meio de cultura.

Foi avaliada a produção quanto ao tipo de inóculo: suspensão de conídios ( $1 \times 10^7$  conídios/mL) e pré-cultura (5% e 10%). Para produção da pré-cultura, 3 discos (diâmetro 7 mm) foram destacados de placas esporuladas e aplicados dentro de frascos *baffled flasks* contendo 50 mL de meio líquido 12:1 (totalizando aproximadamente  $5 \times 10^7$  conídios/mL) e incubados em shaker com condições controladas de temperatura e fotoperíodo durante 3 dias (300 rpm;  $28 \pm 2$  °C; 12 h de fotofase). Para controle de qualidade, a pré-cultura foi diluída, aplicada em placas contendo ágar-nutriente e placas contendo batata-dextrose-ágar (BDA) e incubadas por 48 horas em condições controladas ( $26 \pm 2$  °C; 12 h de fotofase) para verificar a pureza do inóculo.

Para avaliar a cinética de crescimento, diariamente durante 72 horas foi coletada uma amostra da fermentação e avaliada quanto a unidades formadoras de colônia (UFC),

biomassa seca e a produção de microescleródios. As amostras foram submetidas a diluições seriadas e plaqueamento de alíquotas de 100 µL em placas de Petri contendo BDA, sendo a formação de colônias contada a partir de 48 horas de incubação. Para a análise da biomassa seca, unidades de papel filtro de 7 cm foram secados em estufa durante 24 horas (100 °C), 1 mL das amostras foi filtrado no papel, submetido a secagem novamente (24 horas a 100° C) e então pesado em balança de precisão, sendo 3 repetições para cada amostra. No último dia de fermentação, as amostras foram aferidas em morfologia quanto a área em µm<sup>2</sup> dos microescleródios utilizando o software Leica Application Suite (LAS) versão 4.1.0 (2012), e os propágulos aplicados em ágar-água para contagem da taxa de germinação, como descrito no item 3.2.1.

### 3.2.3 Desenvolvimento de formulações com microescleródios de *M. rileyi*

Objetivando a otimização no desempenho dos microescleródios, foram testadas formulações com diferentes ingredientes, sendo eles um umectante do tipo hidrogel em pó (polímero superabsorvente Stockosorb<sup>®</sup> 660, Evonik) para criar um microclima mais úmido favorecendo a germinação, nutrientes (amido de milho e sacarose) e um inerte de origem argilomineral (terra de diatomáceas). As formulações foram padronizadas para 1x10<sup>5</sup> microescleródios/g de formulação, equivalendo a aproximadamente 15% do produto final. Foi considerado como controle a utilização do inerte terra de diatomáceas associado aos microescleródios.

**Tabela 2.** Constituição qualitativa e quantitativa das formulações utilizadas em bioensaios de germinação e esporulação de microescleródios em diferentes unidades relativas (1x10<sup>5</sup> microescleródio/g de mistura).

<b>Formulação / mistura</b>	<b>Terra de diatomáceas (%)</b>	<b>Hidrogel em pó (%)</b>	<b>Amido de milho (%)</b>	<b>Sacarose (%)</b>	<b>Ativo 1x10<sup>5</sup> MS/g (%)</b>
<b>A</b>	85	0	0	0	15
<b>B</b>	45	0	20	20	15
<b>C</b>	55	0	30	0	15
<b>D</b>	50	10	25	0	15
<b>E</b>	45	10	15	15	15

A produção de microescleródios para formular foi feita em frascos em shaker, e os ingredientes das formulações foram adicionados à biomassa fresca e a mistura filtrada em bomba de vácuo acoplada a um frasco Kitassato contendo funil de Buchner e papel filtro de

70 mm. O material retido no filtro foi seco em câmara de fluxo laminar durante 48h, triturado e submetido a secagem novamente até atingir atividade de água igual ou inferior a 0,3 (AquaLab<sup>®</sup> Series TE3). Para armazenamento, o produto final foi acondicionado em sacos de polietileno, embaladas a vácuo e armazenadas em geladeira (aproximadamente 5 °C) para utilização nos experimentos.

### **3.2.4 Avaliação da germinação e esporulação das formulações**

Em seguida, foi avaliada a germinação e esporulação dos microescleródios nas formulações em diferentes condições de umidade relativa do ar. As umidades relativas testadas foram aproximadamente 40 %, 70 %, 80 % e 100% e os microclimas com as respectivas umidades foram criados em caixas plásticas (30 cm comprimento x 19 cm de largura x 12 cm de altura) a partir de soluções salinas saturadas. Utilizou-se MgCl<sub>2</sub> para UR de aproximadamente 40 %, NaCl para aproximadamente 70 %, KCl para aproximadamente 80 % e água destilada para 100% (ROCKLAND, 1960; TAKESHITA; JANKOWSKY, 2015; MEDEIROS, 2006). Estas soluções foram embebidas em algodão e posicionadas em placas de Petri (60 x 15 mm) nas extremidades de cada caixa e acondicionadas em BOD a 25 °C durante 24h antes da montagem do experimento, para estabilização do microclima. A temperatura e umidade relativa dentro de cada caixa foi aferida diariamente utilizando o termohigrômetro Testo<sup>®</sup> 625 através de um pequeno orifício recortado no topo de cada caixa.

A aplicação das formulações foi feita diretamente em placas de Petri (60 x 15 mm) vazias para avaliar a influência direta da umidade do microclima na germinação dos microescleródios. Para isso, 0,03 g de cada formulação foi espalhado nas placas e posicionadas dentro das caixas plásticas, sendo 2 repetições para cada amostra para cada tempo, sendo realizada amostragem destrutiva.

Os parâmetros avaliados foram germinação e esporulação. A germinação foi avaliada através de esteromicroscópio em 24, 32, 48, 72 e 96 horas de incubação. Para a avaliação da produção de conídios, 5 mL de solução Tween (0,05%) foi aplicado dentro de cada placa, recoletada, submetida à diluição seriada e quantificado em câmara de Neubauer.

### **3.2.5 Avaliação da germinação dos microescleródios em diferentes superfícies**

#### **3.2.5.1 Avaliação da germinação na superfície do solo**

Um dos ambientes selecionados para avaliação da germinação dos microescleródios foi o solo, pelo fato de *S. frugiperda* passar parte do seu ciclo de vida no solo, durante o estágio de pré-pupa e devido à possibilidade de queda de formulação no solo durante a aplicação.

Para isso, placas de Petri (60 x 15 mm) foram preenchidas com 10 g de solo peneirado não estéril e ajustado para 15% de capacidade de campo (JACKSON; JARONSKI, 2009), sendo uma placa uma repetição. O solo foi avaliado quanto à capacidade de campo através do método gravimétrico descrito por Estefan, Sommer e Ryan (2013), por meio da saturação do solo e cálculo do teor de água retido através de dados de peso do solo úmido e solo seco. Em seguida, 0,03g da mistura de microescleródios e terra de diatomáceas foi distribuída sobre o solo e incubada em BOD ( $26 \pm 2$  °C; 12 h fotofase) dentro de caixas plásticas contendo algodão embebido em água destilada nas extremidades (UR 100%). A taxa de germinação foi avaliada em 24, 48 e 72 horas através de estereomicroscópio. Ao todo, foram feitas 15 repetições para cada intervalo de tempo e o experimento repetido duas vezes no tempo.

#### **3.2.5.2 Avaliação da germinação de microescleródios em soja e milho**

Durante testes preliminares foi observado que os microescleródios germinavam melhor sobre o milho do que sobre o ágar-água. Para confirmar a hipótese de que essas estruturas germinariam melhor sobre a superfície de plantas, foi avaliado a germinação e produção de conídios de microescleródios sobre folhas de milho e soja (não-transgênicos) comparativamente ao ágar-água (2%). Para isso, folhas de milho foram cortadas em 3 x 3 cm e folhas de soja com tamanhos similares foram coletadas. As folhas passaram por processo de esterilização externa sendo submersas em hipoclorito de sódio 0,02%, álcool 70% e água destilada, seguidas de exposição em luz UV durante 15 minutos para cada face da folha. As folhas foram posicionadas sobre placas contendo ágar-água para criar o microclima com umidade ideal para germinação. Em seguida, 0,02 g da mistura de microescleródios + terra de diatomáceas foi aplicado sobre as folhas e sobre placas de Petri e espalhado com alça de

Drigalski. As placas foram incubadas durante 6 dias (26 °C; 100% UR), sendo a germinação avaliada nos dias 1, 2, 3 e 4 e a produção de conídios nos dias 3, 4 e 6.

A germinação também foi avaliada em casa de vegetação e campo e para garantir a permanência dos microescleródios nas plantas, estruturas retangulares (2,5 x 3 cm) foram confeccionadas em etileno vinil acetato (EVA) e fixadas às folhas através de grampos (Figura 2). Em casa de vegetação, a temperatura e umidade foram monitoradas através de *data loggers* (Instrutherm® HT900), e as análises de germinação foram feitas com 72 horas de exposição da mistura de microescleródios e terra de diatomáceas nas plantas. Utilizou-se em casa de vegetação e campo o tempo 72 horas pois com 48 horas ainda não havia projeção de hifas.

Para a contagem da taxa de germinação, utilizou-se estereomicroscópio e foram considerados germinados estruturas melanizadas com projeções de hifas. Para avaliar a produção de conídios sobre as folhas, estas foram transferidas para tubos Falcon contendo 10 mL de Tween 80 (0,05%), submetidas a agitação do vórtex e diluídas para contagem de conídios em câmara de Neubauer. Para as placas contendo ágar-água + mistura de TD e microescleródios, 10 mL de Tween 80 (0,05%) foram adicionados às placas, esfregadas com alça de Drigalski e em seguida o líquido foi recolhido e transferido para tubos onde foi realizada diluição seriada e contagem em câmara de Neubauer.



**Figura 2.** Estrutura confeccionada em EVA e fixada na planta com objetivo de re coletar a mistura contendo microescleródios para análise em estereomicroscópio.



### 3.2.6 Vida de prateleira

A avaliação do tempo de prateleira foi realizada durante 6 meses. Para isso amostras de 0,1 g foram pesadas, individualizadas em sacos de polietileno e embalados a vácuo. As embalagens contendo o fungo, já seladas, foram posicionadas dentro de uma segunda embalagem contendo sachês à base de ferro (Ageless®), objetivando reduzir a concentração de oxigênio na embalagem, seladas a vácuo novamente e acondicionadas em BOD ( $26 \pm 2$  °C), geladeira (aproximadamente 5° C) e freezer (aproximadamente  $-20$ °C), sendo feitas três replicatas para cada ambiente. A taxa de germinação foi avaliada em ágar-água (2%) através da pesagem de 0,02 g de cada amostra, espalhamento com alça de Drigalski e acondicionamento das placas contendo as amostras em BOD ( $26 \pm 2$  °C; 12 h fotofase). A avaliação da germinação foi realizada em 24h e 48h, pois o armazenamento de fungos pode retardar o seu tempo de germinação (FARIA et al., 2010; SONG et al., 2014).

### 3.2.7 Análise estatística

Todos os dados foram avaliados quanto à normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene ou Bartlett), e quando os pressupostos foram atendidos, utilizou-se o teste Repeated Measures ANOVA para dados repetidos no tempo e One-Way ANOVA para dados sem variação no tempo. Quando não atendidos, utilizou-se de transformações (raiz quadrada, raiz cúbica e logarítmica) ou modelos lineares generalizados (GLM). As análises foram realizadas nos softwares R (R CORE TEAM, 2023) e Software Statistica® versão 10.0 (STATSOFT, 2011).

Para análise do experimento de produção de microescleródios em meios de cultura com diferentes razões de carbono e nitrogênio (C:N), os dados não atenderam normalidade e homocedasticidade, portanto foram ajustados a um modelo de regressão quadrática. Dados de produção de conídios pelos microescleródios foram analisados pelo teste One-Way ANOVA, dados de biomassa seca foram transformados em raiz quadrada e analisados pelo mesmo teste. Dados de morfologia das estruturas (área em  $\mu\text{m}^2$ ) foram transformados em log na base 10, ajustados em um modelo linear generalizado com distribuição Gamma. Todas as comparações de média foram realizadas através do teste de acompanhamento Tukey HSD a 5% de significância.

Os dados de produção de microescleródios em biorreator de bancada foram analisados através do teste One-Way ANOVA, a biomassa seca das produções ao longo dos

dias foi avaliado através do teste Repeated Measures ANOVA e os dados de unidades formadoras de colônia (UFC) ao longo dos dias foram transformados em log na base 10 e avaliados por Repeated Measures ANOVA. Dados de morfologia das estruturas (área em  $\mu\text{m}^2$ ) foram transformados em log na base 10, ajustados em um modelo linear generalizado com distribuição Gamma. A comparação de médias foi realizada através do teste de acompanhamento Tukey HSD a 5% de significância

Para análise da germinação de diferentes formulações, os dados foram ajustados a um modelo linear generalizado (GLM) família quasibinomial seguido de ANOVA. Para análise da produção de conídios dessas formulações, os dados foram transformados em log na base 10 e analisados pelo teste Repeated Measures ANOVA. A comparação de médias foi realizada através do teste de acompanhamento Tukey HSD a 5% de significância.

Os dados de germinação em diferentes superfícies (ágar-água, milho e soja) foram ajustados em um modelo quasibinomial e a produção de conídios também em diferentes superfícies foram ajustados em um modelo linear generalizado (GLM) binomial negativo. A comparação de médias foi realizada através do teste de acompanhamento Tukey HSD a 5% de significância. Para análise da germinação no solo, os dados atenderam aos pressupostos de homocedasticidade e normalidade dos resíduos e foram analisados pelo teste One-Way ANOVA, seguido pelo teste de acompanhamento Tukey HSD a 5% de significância.

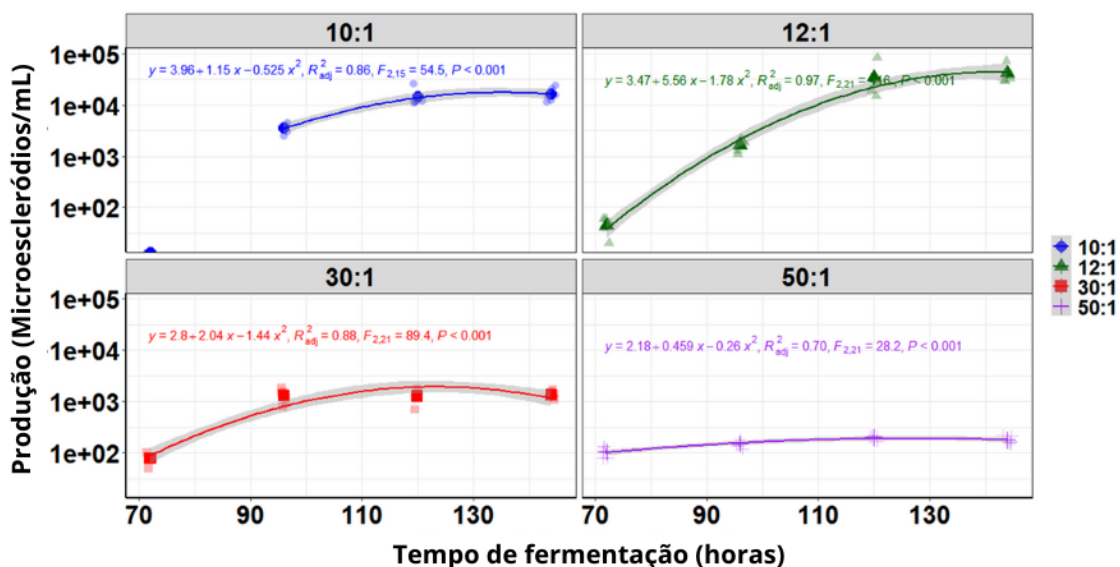
Os dados de germinação ao longo do tempo na avaliação da vida de prateleira foram ajustados em um modelo quasibinomial, seguido do teste ANOVA. Para dados de produção de conídios do mesmo experimento, pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram atendidos, sendo realizado o teste ANOVA para medidas repetidas.

### **3.3 Resultados**

#### **3.3.1 Produção de microescleródios em meios de cultura com diferentes razões de carbono e nitrogênio (C:N)**

Quanto à obtenção de microescleródios nos meios com diferentes razões de carbono e nitrogênio, obteve-se produção deste propágulo em todas as razões testadas (10:1, 12:1, 30:1 e 50:1), sendo formados os primeiros propágulos a partir de 72 horas de fermentação. Além disso, foi observado formação de enovelados de hifas não compactados e não melanizados, que poderiam vir a se tornar microescleródios com mais tempo de fermentação e/ou otimização do meio. Obteve-se também presença de blastosporos ao longo da fermentação e produção de conídios nas paredes do frasco.

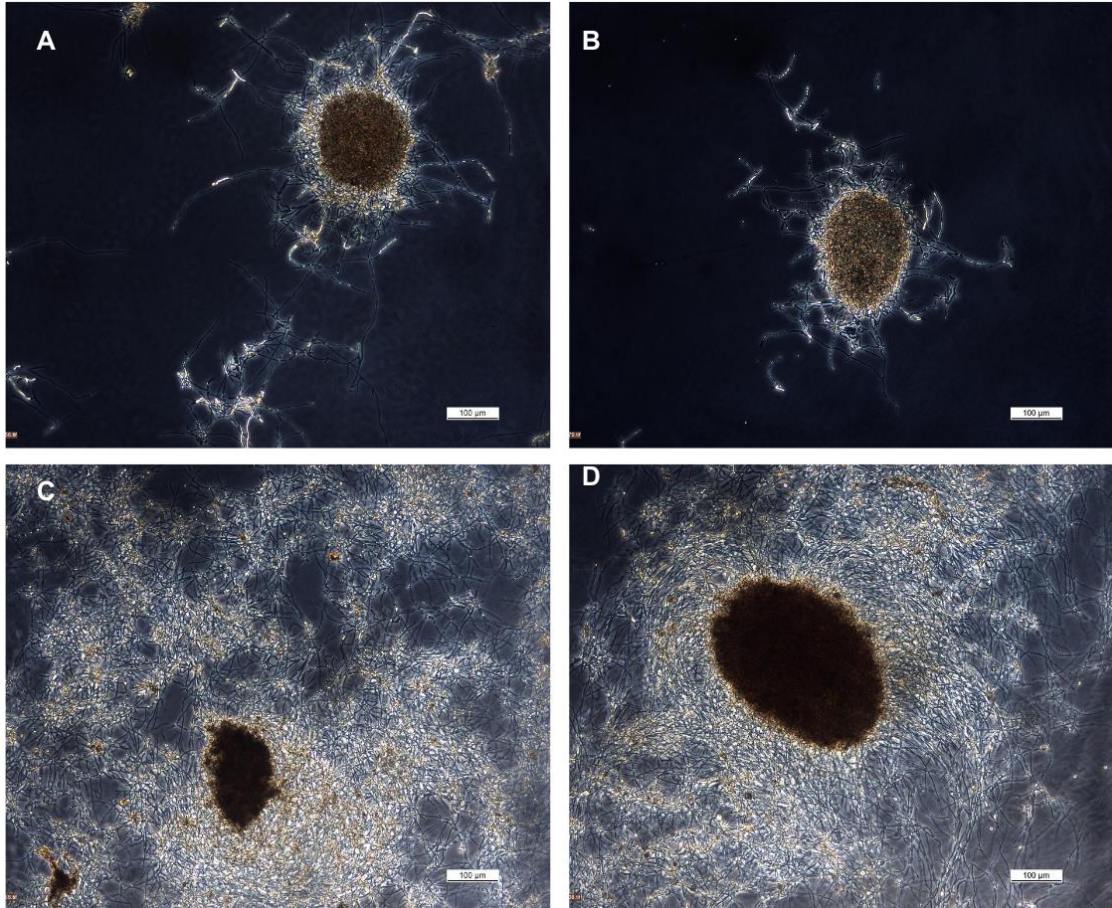
Quanto ao desempenho na produção, constatou-se que a razão entre carbono e nitrogênio no meio é um fator essencial na produção de microescleródios de *M. rileyi*, ocorrendo diferença estatística entre todas as curvas nos diferentes intervalos de tempo (entre as razões  $F = 22, 189$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ; entre os tempos  $F = 190, 246$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0,001$ ; razões em relação ao tempo  $F = 31,729$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 3). Razões menores (10:1 e 12:1) foram mais eficientes na produção de *M. rileyi*, apresentando maior produção de microescleródios/mL ( $1,7 \times 10^4$  e  $4,1 \times 10^4$ , respectivamente) enquanto razões maiores (30:1 e 50:1) apresentaram uma produção pequena ( $1,4 \times 10^3$  e  $1,8 \times 10^2$ , respectivamente) e uma grande proporção de hifas dispersas.



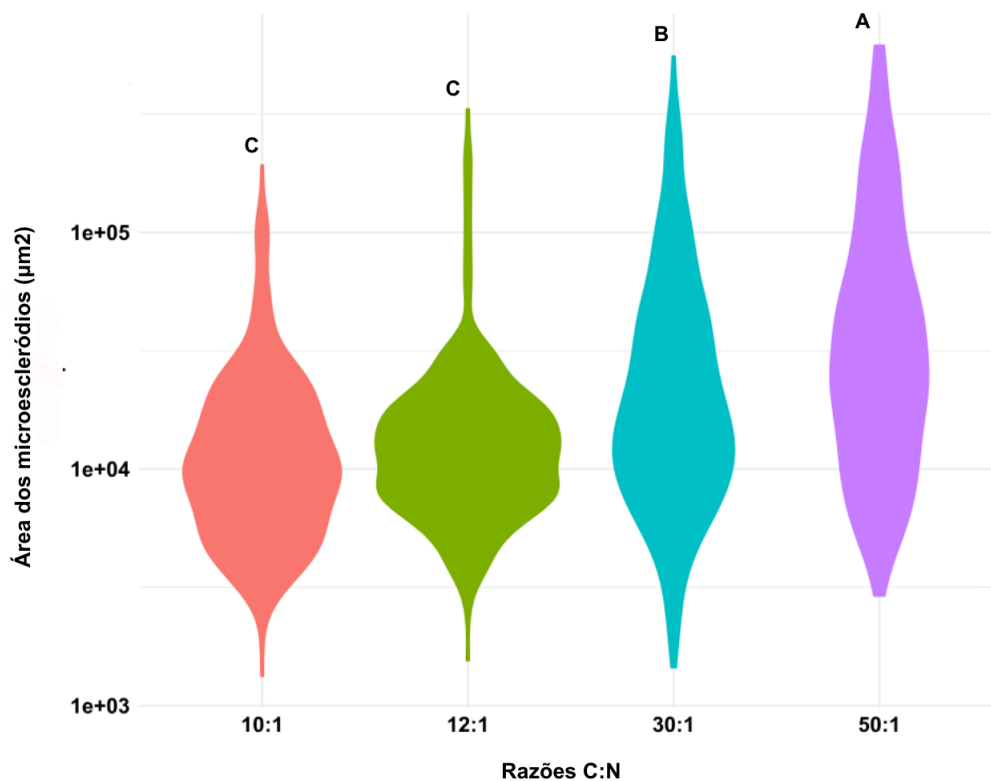
**Figura 3** Produção de microescleródios/mL de *M. rileyi* em diferentes razões de carbono e nitrogênio ao longo de 144 horas de fermentação (6 dias). Valor de  $p < 0,05$  aponta diferença estatística entre as médias para os diferentes tempos pelo teste de Tukey HSD.

Em relação à morfologia das estruturas, foi observada grande variação no tamanho dos propágulos nos meios 30:1 e 50:1 ( $3,9 \pm 6,19 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  e  $6,8 \pm 11 \times 10^4$ , respectivamente) além de uma grande quantidade de hifas agregadas (Figura 4 e 5). A razão 50:1 obteve estruturas com o maior tamanho e a maior heterogeneidade, já nas razões menores (10:1 e 12:1) as estruturas além de mais numerosas apresentaram tamanho menor, mais regular, homogêneo ( $1,6 \pm 1,97 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  e  $1,8 \pm 3,1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ , respectivamente) e com menor concentração de hifas agregadas (Figura 4 e 5). Quanto a melanização das estruturas, nas razões maiores (30:1 e 50:1) foi evidente uma maior melanização dos propágulos (Figura

4). Diante disso, a produção e morfologia foram os principais pontos a serem considerados na seleção do meio de cultura 12:1 para o seguimento dos experimentos.



**Figura 4.** Microescleródios de *M. rileyi* ESALQ 5611 referentes às razões C:N 10:1 (a), 12:1 (b), 30:1 (c) e 50:1 (d) após 6 dias de fermentação líquida.



**Figura 5.** Análise da morfologia através da área em  $\mu\text{m}^2$  de microescleródios de *M. rileyi* ESALQ 5611 produzidos em meios com diferentes razões C:N. Letras diferentes apontam diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

A produção de conídios por mL de produção de microescleródios não apresentou diferença estatística entre os meios com diferentes razões C:N ( $F = 2,21$ ;  $p = 0,108$ ). Contudo, em relação à biomassa seca, o meio 12:1 diferiu estatisticamente dos demais, apresentando uma biomassa seca média de 32 g/L ( $F = 8,329$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,0003$ ) (Tabela 2).

**Tabela 3.** Produção de conídios por mL de fermentado contendo microescleródios a fresco e biomassa seca (g/L) nos meios com diferentes razões C:N.

<b>Razão C:N</b>	<b>Produção de conídios/mL (x 10<sup>6</sup>)</b>	<b>Biomassa seca (g/L)</b>
<b>10:1</b>	5,1 ± 1,65 <b>A</b>	21,3 ± 5,68 <b>B</b>
<b>12:1</b>	6,7 ± 1,39 <b>A</b>	32 ± 10,09 <b>A</b>
<b>30:1</b>	3,9 ± 1,51 <b>A</b>	19,4 ± 7,48 <b>B</b>
<b>50:1</b>	5,2 ± 4,58 <b>A</b>	15,5 ± 5,64 <b>B</b>
<i>F</i>	2,2103	8,329
<i>df</i>	3	3
<b>p-valor</b>	0,10819	0,00031

Médias (± desvio padrão) seguidas de letras diferentes na coluna indicam diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

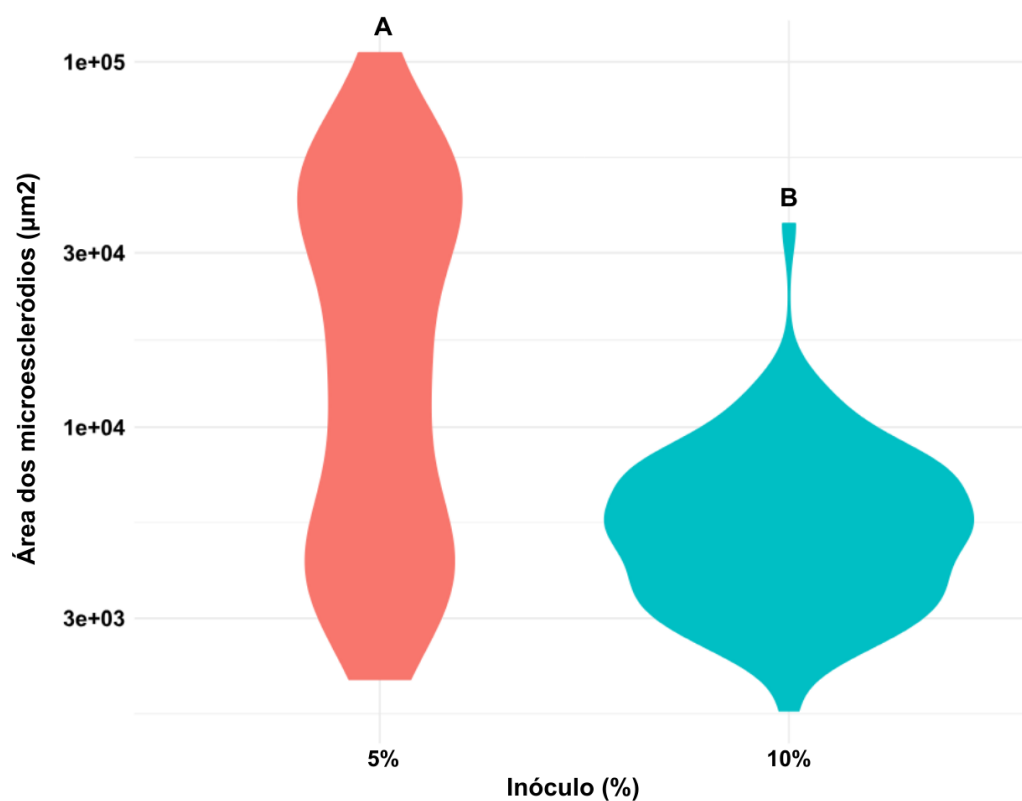
### 3.3.2 Produção de microescleródios em biorreator de bancada

Na produção de microescleródios em biorreator de bancada, quando utilizado inóculo de conídios ( $5 \times 10^7$  conídios/mL), não ocorreu formação de microescleródios em até 6 dias de fermentação, apenas biomassa. Observou-se que a produção de microescleródios com 72 horas de fermentação foi maior quando utilizado 10% de inóculo de pré-cultura ( $1,5 \times 10^4$  MS/mL) (Tabela 4). Contudo, quando avaliado os parâmetros de biomassa seca (g/L) e unidades formadoras de colônia (UFC), não foi observada diferença estatística entre os tratamentos ( $F = 0,11567$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,750890$  e  $F = 5$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,089085$ , respectivamente) em nenhum dos tempos de avaliação (24, 48 e 72 horas) (Tabela 4). Quanto à morfologia, ficou evidente grande variação no tamanho das estruturas ( $2,4 \pm 2,3 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ) quando a cultura foi iniciada com 5% de inóculo, enquanto 10% de inóculo resultou em estruturas mais homogêneas ( $6,0 \pm 4,1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) (Figura 6). Em relação à germinação, os microescleródios frescos (recém produzidos) de todas as bateladas apresentaram 100% de germinação sobre o ágar-água após 48 horas de incubação. Apesar do encurtamento no tempo de produção em relação à fermentação em shaker, os parâmetros e meio de cultura para biorreator ainda podem ser otimizados para aumento no número de propágulos, redução na quantidade de hifas e produção de estruturas mais homogêneas em tamanho.

**Tabela 4.** Produção de microescleródios (MS/mL), biomassa seca (g/L) e UFC em biorreator de bancada com diferentes concentrações de inóculo após 72 horas de fermentação.

Inóculo	Produção de MS/mL (x 10 <sup>3</sup> )	Biomassa seca (g/L)	UFC (x 10 <sup>6</sup> )
5%	6,4 ± 2,98 B	0,046 ± 0,008 A	4,3 ± 1,53 A
10%	14,7 ± 1,21 A	0,047 ± 0,018 A	3,8 ± 0,09 A
<i>F</i>	39,285	0,11567	5,00
<i>df</i>	1	1	1
<i>p</i> -valor	<i>p</i> < 0,0001	0,750890	0,089085
Teste	One-way ANOVA	ANOVA repeated measures	ANOVA repeated measures

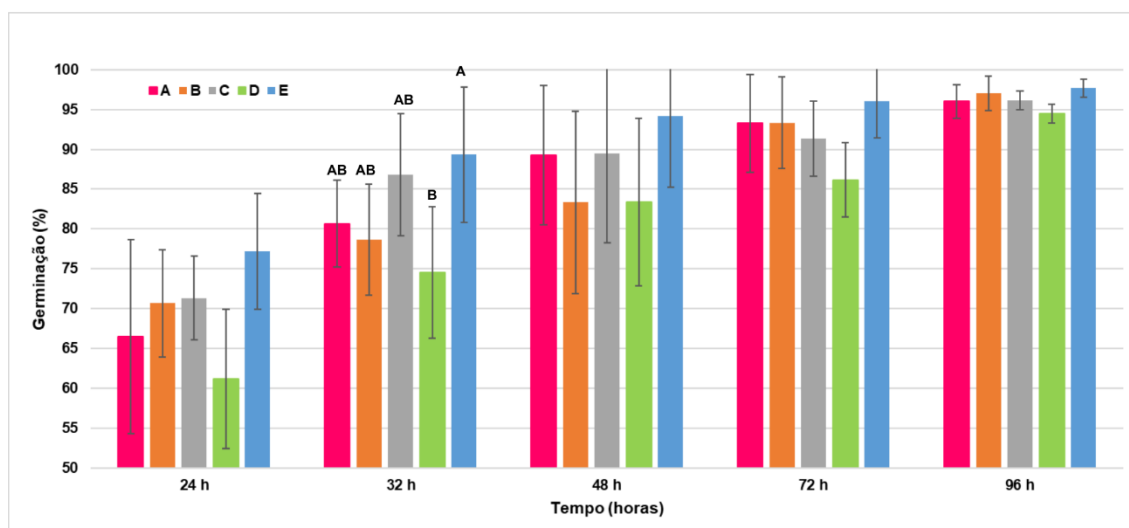
Médias (± desvio padrão) seguidas de letras diferentes na coluna indicam diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey (*p* < 0,05).



**Figura 6.** Análise da morfologia através da área em µm<sup>2</sup> de microescleródios produzidos em biorreator de bancada com diferentes concentrações de inóculo de pré-cultura. Diferentes letras apontam diferença estatística entre os tratamentos (*p* < 0,05).

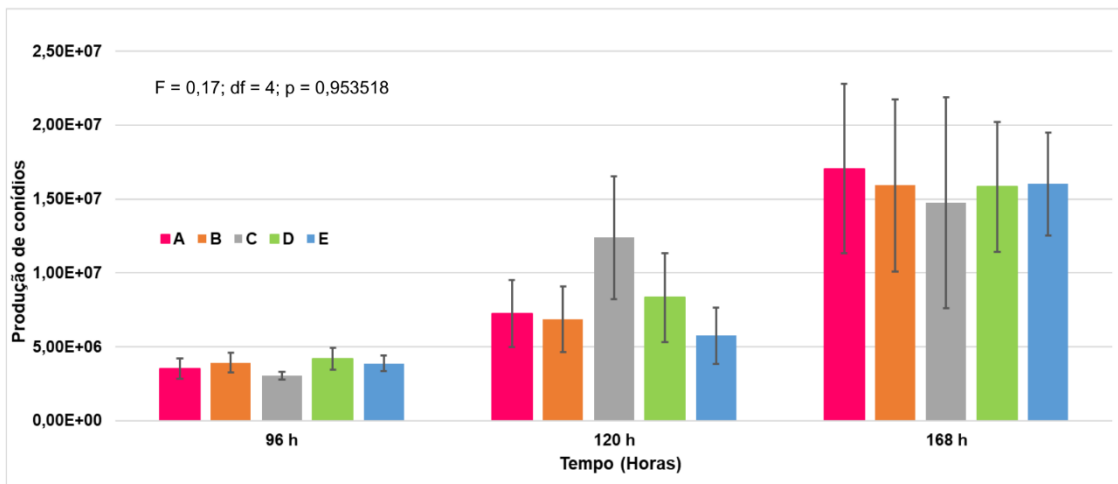
### 3.3.3 Avaliação de formulações para otimização da germinação e esporulação de microescleródios de *M. rileyi* e vida de prateleira

Não foi observada germinação em nenhuma das formulações nos microclimas com umidades relativas abaixo de 100%. Quanto à germinação entre as diferentes formulações, quando submetidas à umidade relativa próxima de 100%, todas alcançaram germinação acima de 80% em 48 horas e acima de 90% em 96 horas. Na análise ao longo do tempo, somente o tempo 32 horas apresentou diferença estatística entre os tratamentos ( $F = 9,7516$ ;  $df = 4$ ;  $p < 0,0001$ ), sendo apontado a formulação E (terra de diatomáceas 45%, hidrogel em pó 10%, amido de milho 15%, sacarose 15%) com maior germinação em relação à formulação D (terra de diatomáceas 50%, hidrogel em pó 10% e amido de milho 25%) (Figura 7). Quando analisada a produção de conídios ao longo do tempo, não ocorreu diferença estatística entre os tratamentos em nenhum dos tempos ( $F = 0,17$ ;  $df = 4$ ;  $p = 0,95$ ) sendo produzida uma média de  $3,7 \times 10^6$ ,  $8,1 \times 10^6$  e  $1,6 \times 10^7$  conídios/g em 96, 120 e 168 horas de incubação, respectivamente (Figura 8). Diante disso, para a continuidade do trabalho optou-se por utilizar a mistura A (terra de diatomáceas 85%), que é o padrão para microescleródios comumente encontrado na literatura.



**Figura 7.** Taxa de germinação de microescleródios ao longo do tempo em diferentes formulações, acondicionados em umidade relativa próxima a 100%. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos para o mesmo período pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).





**Figura 8.** Barras contendo a média  $\pm$  desvio padrão. Produção de conídios por microescleródios em diferentes formulações ao longo do tempo. Não ocorreu diferença estatística entre as médias segundo teste de Tukey HSD ( $p < 0,05$ ).

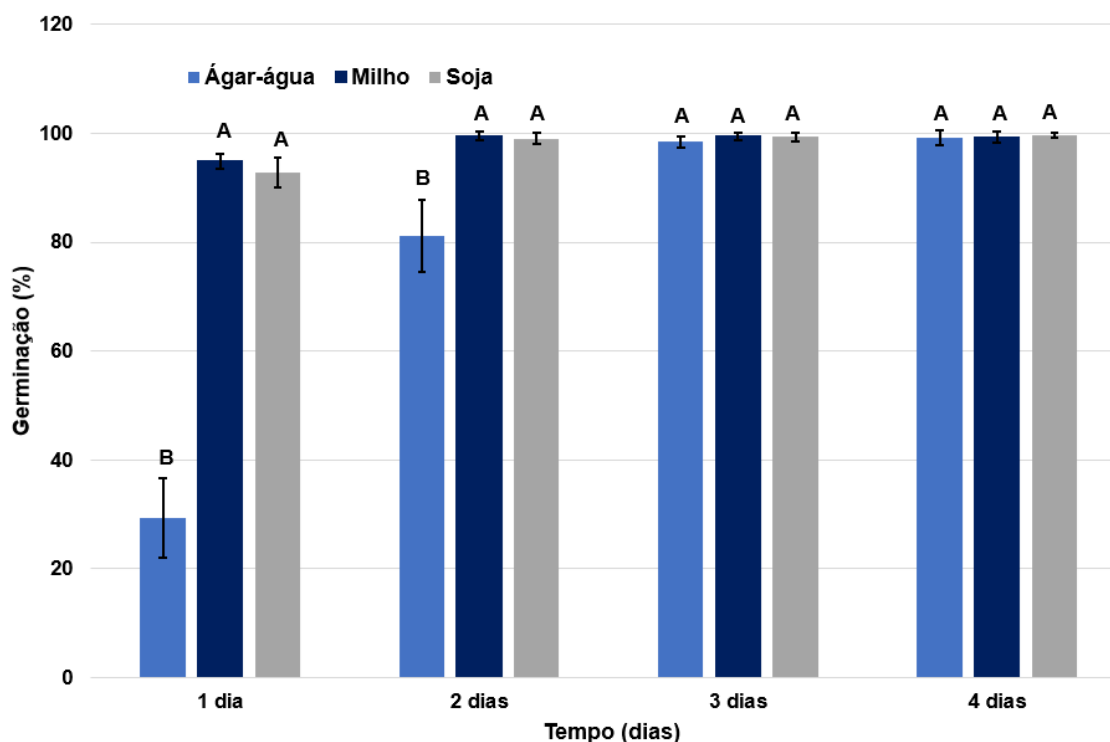
Em relação à vida de prateleira, em apenas 1 mês de armazenamento, o conteúdo já apresentou contaminação por bactérias na BOD (Figura 9), mostrando não ser possível armazenamento em temperatura ambiente para a metodologia testada. As formulações armazenadas em freezer e geladeira não apresentaram diferença na germinação ( $F = 3,83$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,075$ ) e produção de conídios ( $F = 3,84$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,18$ ) entre os 6 meses de armazenamento, germinação 98% e produção de conídios média de  $1,4$  e  $1,2 \times 10^9$  conídios/g de mistura contendo microescleródios, respectivamente).



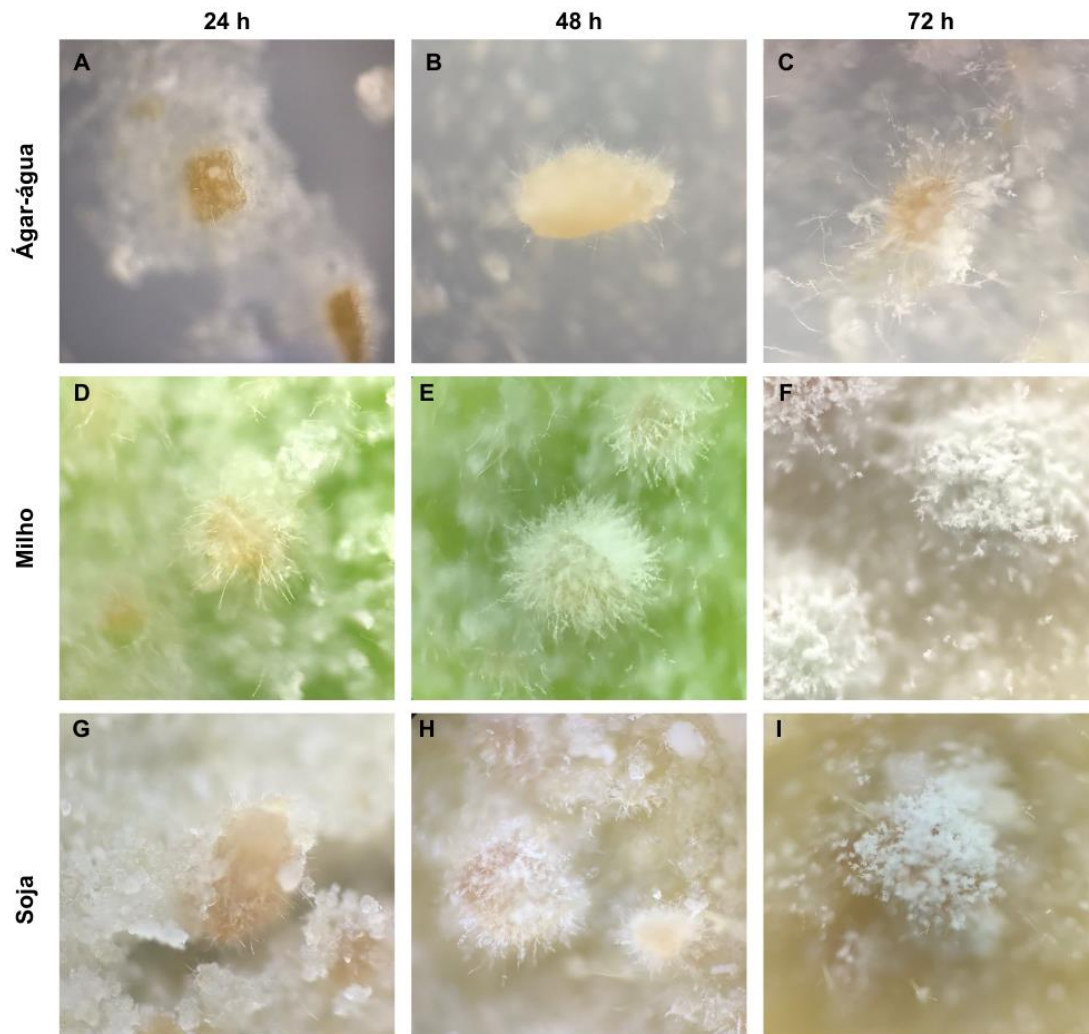
**Figura 9.** Mistura de microescleródios e terra de diatomáceas distribuídos sobre folha de milho e incubados em BOD sobre ágar-água. Armazenamento durante um mês em diferentes ambientes, da esquerda para direita: freezer ( $-20$  °C), geladeira (aproximadamente  $5$  °C) e BOD ( $26 \pm 2$  °C), sendo que a mistura armazenada em BOD contaminou.

### 3.3.4 Germinação dos microescleródios em diferentes superfícies: solo, folhas e ágar

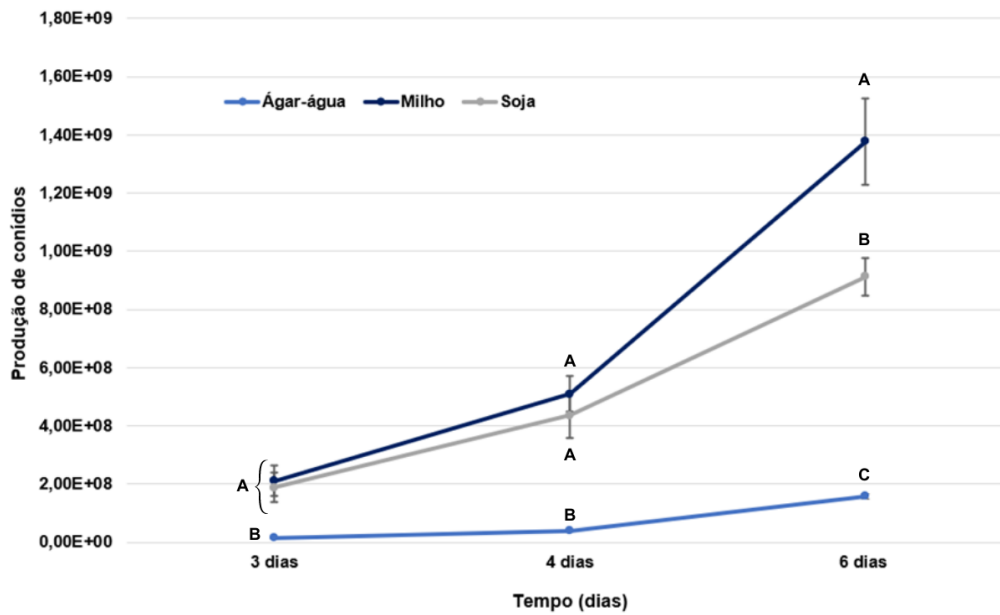
A comparação da germinação entre ágar-água e folhas de milho e soja apontou uma germinação mais rápida sobre as plantas nos dias 1 e 2 de incubação do que sobre a superfície do ágar ( $F = 453,36$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 10 e 11). A produção de conídios também foi superior sobre as folhas em comparação ao ágar-água em todos os 6 dias de avaliação ( $F = 16,92$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 12), sendo no último dia de avaliação a produção de conídios pelos microescleródios sobre a folha de milho ( $1,38 \pm 0,15 \times 10^9$  conídios/g de mistura com microescleródios) superior que sobre as folhas de soja ( $9,13 \pm 0,65 \times 10^8$  conídios/g de mistura com microescleródios) (Figura 12). Sendo assim, concluiu-se que a germinação e esporulação dos microescleródios de *M. rileyi* sobre as folhas de milho e soja foi superior a ágar-água.



**Figura 10.** Barras contendo média  $\pm$  desvio padrão. Germinação de microescleródios em diferentes superfícies ao longo do tempo. Letras diferentes apontam diferença estatística entre os tratamentos para o mesmo período segundo teste de Tukey HSD ( $p < 0,05$ ).

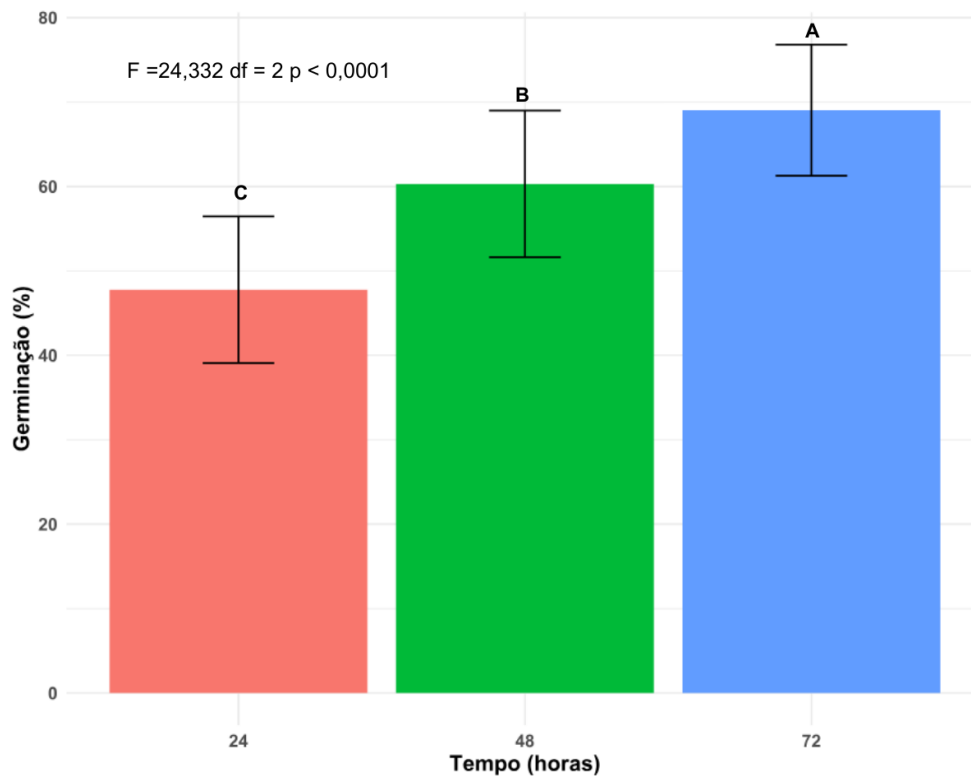


**Figura 11.** Germinação de microescleródios de *M. rileyi* ao longo do tempo sobre a superfície de diferentes substratos: ágar-água (A, B e C), milho (D, E e F) e soja (G, H e I).



**Figura 12.** Produção de conídios por microescleródios por g de mistura MS + TD em diferentes superfícies ao longo do tempo. Letras diferentes apontam diferença estatística entre os tratamentos para o mesmo período segundo teste de Tukey HSD ( $p < 0,05$ ).

Na superfície do solo, o crescimento de hifas iniciou com 24 horas, e a taxa de microescleródios germinados aumentou estatisticamente entre 24, 48 e 72 horas (Figura 13), sendo iniciada a esporulação com 72 horas e alcançando uma média de 69% de propágulos germinados. Em casa de vegetação, foram observadas taxas entre 0 e 10% de germinação dos microescleródios sobre as plantas em 72 horas de exposição, enquanto no campo a germinação variou de 0 a 52%, dependendo do posicionamento da planta nas linhas da plantação no campo (borda ou centro da plantação).



**Figura 13.** Barras contendo média  $\pm$  desvio padrão. Germinação da mistura de microescleródios de *M. rileyi* ao longo do tempo em solo natural ( $26 \pm 2$  °C; UR% 100%; 12 horas fotofase). Diferentes letras apontam diferença estatística segundo teste de Tukey HSD ( $p < 0,05$ ).

### 3.4 Discussão

Estudos mostram a grande influência de altas concentrações de carbono em meios de cultura e variações na razão de carbono e nitrogênio para produção de microescleródios (JARONSKI. JACKSON, 2008; JACKSON; JARONSKI, 2009; BEHLE; JACKSON, 2014; SONG et al., 2014; LIRA, 2019). No presente trabalho, maiores taxas de produção foram observadas em meios com razão C:N menores (10:1 e 12:1), contudo, em trabalhos como de Jaronski e Jackson (2008) e Mascarin et al. (2014), a produção de microescleródios de *Metarhizium* spp. apresentaram destaque em razões maiores de carbono e nitrogênio (30:1 e 50:1). Jackson e Jaronski (2009), em seu trabalho com produção de microescleródios de *M. anisopliae*, apontam que o isolado MA1200 obteve maior produção nas razões 10:1 e 50:1, enquanto no isolado F52 a produção foi maior nas razões 30:1 e 50:1. Portanto, é uma característica que apresenta variação de isolado para isolado, mesmo que dentro de um mesmo gênero e até mesmo espécie.

Song et al. (2014) otimizaram um meio de cultura para produção de microescleródios de *M. rileyi* à base de glucose, citrato de amônio e sais basais ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e obtiveram produções de até  $2,2 \times 10^5$  em 6 dias de fermentação. O mesmo meio (*Amended Medium*) foi utilizado para testes prévios com os isolados de *M. rileyi* ESALQ5611 e ESALQ1305 (dados não publicados) e não produziram microescleródios melanizados, apenas pellets miceliais. Isso mostra como são amplas e surpreendentes a variabilidade genética e a especificidade dentro de *M. rileyi*, sendo necessária uma exploração mais aprofundada do perfil genômico dos isolados para buscar assinaturas genéticas que se correlacionem com a característica fenotípica desejada, que neste caso seria a produção de microescleródios melanizados, com a finalidade de favorecer a resistência a luz UV (DEVI et al., 2007; QIN et al., 2009; FRONZA et al., 2017).

Apesar de uma produção significativamente maior nos meios com menores razões C:N, visto que a maior quantidade de N nesses meios contribuem para aumento da biomassa vegetativa do fungo, a melanização das estruturas, por sua vez, foi evidentemente mais intensa e mais homogênea em microescleródios produzidos nos meios com maiores razões (30:1 e 50:1), corroborando os resultados obtidos por Jackson e Jaronski (2009), que também obtiveram estruturas mais melanizadas nas razões 30:1 e 50:1. A pigmentação ou melanização dessas estruturas é uma característica marcante e tudo indica que há forte ligação com a escassez de nitrogênio no meio e indução de genes atrelados ao estresse oxidativo e biogênese de peroxissomos em *Metarhizium* (Paixão et al., 2021). Nos meios com menores razões, os microescleródios apresentaram diferentes graus de melanização entre os propágulos, e uma melanização mais homogênea pode ser alcançada com a extensão do tempo de fermentação. Mascarin et al. (2014) também destacam essa característica em produções de microescleródios de diferentes espécies do gênero *Metarhizium*. Contudo, no presente estudo, apesar da melanização não ser tão intensa, não houve alteração na germinação das estruturas após secagem, conforme demonstrado em dados de germinação em diferentes superfícies e tempo de armazenamento. Estudos seriam necessários para avaliar a resistência destas estruturas com diferentes graus de melanização em exposição a faixas de radiação UV e temperatura.

Em relação ao escalonamento de produção para biorreator, foi observado que uma alta rotação e aeração foram essenciais para a produção de microescleródios de *M. rileyi*, sendo que condições baixas desses parâmetros foram testadas previamente e obteve-se uma baixa (ou nula) produção de microescleródios e uma grande concentração de hifas (FETTER et al., 2022 dados não publicados). Esses dados corroboram com o trabalho de Song et al.

(2017), que apontaram a rotação e aeração como pontos essenciais na produção de microescleródios de *M. rileyi* tanto em shaker quanto em biorreator, sendo que parâmetros mais altos de rotação e aeração produziram mais propágulos. Além disso, Song et al. (2017) também apontaram que durante a fermentação para produção de microescleródios, *M. rileyi* consome uma grande quantidade de oxigênio diluído, característica que também foi observada no isolado ESALQ5611. Contudo, para Jackson e Jaronski (2012), em seu trabalho de escalonamento de produção de microescleródios de *M. brunneum* em biorreator, a produção deste propágulo não foi afetada pelas variações na agitação e aeração, mostrando assim mais uma vez a singularidade de *M. rileyi* dentro do gênero *Metarhizium*.

Outro ponto essencial observado na produção de microescleródios em biorreator foi o tipo de inóculo e a concentração deste. Tentativas de produção com inóculo de conídios produziram muita biomassa e quantidades nulas ou muito baixas de microescleródios. Quanto a pré-cultura, observou-se que a utilização de 10% de inóculo produziu quantidades consideravelmente maiores que 5%, corroborando novamente com Song et al. (2017), que apontaram o fato de densidades maiores do inóculo gerarem resultados melhores para produção de *M. rileyi* tanto em shaker quanto em biorreator.

Em relação às formulações testadas, a hipótese inicial era que o hidrogel em pó (ou polímero superabsorvente) auxiliasse na germinação em baixas condições de umidade, captando a umidade do ar e criando um microclima favorável a germinação dos microescleródios. Gardescu et al. (2017) tiveram a mesma proposta em seu trabalho de campo com formulação de microescleródios contendo hidrogel para controle de *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky) (Coleoptera: Cerambycidae) em árvores. Assim como no trabalho de Gardescu et al. (2017), o hidrogel não teve o desempenho esperado no presente estudo, pois apesar de gerar uma germinação mais rápida, a produção de conídios foi igual em todas as formulações, e no último dia de avaliação, todos alcançaram a mesma taxa de germinação. Além disso, o hidrogel não proporcionou germinação em umidades relativas menores que 100%, o que era o principal objetivo na sua utilização. Rodrigues et al. (2021) também destacaram a necessidade de umidade relativa alta para a germinação de grânulos e pellets contendo microescleródios de *M. humberi*, sendo necessário UR >91% para germinação em grânulos e UR >93% para germinação em pellets. Também foi observado início da conidiogênese em 4 dias de incubação, corroborando com o presente trabalho.

Neste estudo, utilizamos apenas a terra de diatomáceas como veículo carreador inerte, e variamos apenas os outros componentes nas formulações. Contudo, Rodrigues et al. (2021) testaram diferentes inertes e relataram diferenças significativas entre os tipos de

componentes utilizados, destacando a vermiculita como o melhor. Goble et al. (2016) utilizaram hidromulch associado a microescleródios de *M. brunneum* em campo e obtiveram resultados satisfatórios na produção de conídios, estabilidade e controle da praga alvo *A. glabripennis*. Nesse sentido, poderia ser de grande relevância para continuidade do trabalho o estudo de novos componentes para formulação, como diferentes inertes e umectantes.

Quanto ao armazenamento e vida de prateleira, foi observado que para a metodologia utilizada na hora de formular, o armazenamento em temperatura ambiente seria inviável, devido a resquídeos de meio de cultura rico em carbono presentes na formulação, que acarretaram no crescimento de bactérias. Jackson e Schisler (1995) também apontaram crescimento de bactérias contaminantes em formulação de microescleródios armazenadas em temperatura ambiente. Contudo, as formulações armazenadas em freezer e geladeira não tiveram redução na sua germinação e produção de conídios em até 6 meses de armazenamento, que foi o tempo máximo considerado nesse estudo. Apesar da mistura de terra de diatomáceas de microescleródios não ter possibilitado longevidade em temperatura ambiente, a estabilidade em geladeira e freezer foi ótima, corroborando com trabalhos de Yousef-Yousef et al. (2022) e Jackson e Jaronski (2012), que avaliaram armazenamento de *M. brunneum* em freezer e geladeira.

Segundo Mascarin et al. (2018), a vida de prateleira é um dos principais pontos que limita a distribuição de micoinseticidas no Brasil, e devido ao fato de ser uma estrutura de resistência, microescleródios apresentam uma tolerância naturalmente maior para serem armazenados. Song et al. (2014) observaram que a germinação de microescleródios de *M. rileyi* armazenados em temperatura ambiente passou a reduzir a partir de 6 meses, e com 12 meses ainda apresentavam 86,4% de propágulos viáveis. Yousef-Yousef et al. (2022) em seu trabalho com microescleródios de *M. brunneum* tiveram redução na produção de conídios a partir de 8 meses de armazenamento em freezer e geladeira. Jackson e Jaronski (2012) em seu estudo com microescleródios de *M. brunneum* em 12 meses de armazenamento em geladeira não apresentaram diferença na produção de conídios pelos propágulos.

Em relação ao desempenho de fungos entomopatogênicos em diferentes superfícies, inúmeros trabalhos já demonstraram como microhabitats de folhas e do solo afetam o desempenho desses microrganismos, seja de forma benéfica ou antagonista (CORY; ERICSSON, 2009; JARONSKI, 2010). Dentre os fatores presentes nesses microhabitats que podem afetar os fungos entomopatogênicos estão a diferença na temperatura em relação ao ambiente (BURRAGE, 1971; CHU et al., 1994; CORY; ERICSSON, 2009), umidade relativa (JARONSKI, 2010), composição química (GALLARDO et al., 1990; VEGA et al., 1997;



INYANG et al., 1998; UGINE et al., 2007; CORY; ERICSSON, 2009) e produção de voláteis (INYANG et al., 1999; HOUNTONDI et al., 2006).

No presente estudo, foi observado diferenças na germinação e produção de conídios dos microscleródios de *M. rileyi* entre ágar-água, folhas de milho e folhas de soja, sendo obtidos melhores resultados sobre as folhas das plantas, e a produção de conídios especificamente sobre a folha do milho. Dentre os possíveis fatores responsáveis por essa diferença, podemos destacar as inúmeras características físico-químicas dos microhabitats de filoplanos citados anteriormente, que podem ter favorecido o desempenho dos propágulos. O trabalho de Inyang et al. (1999) mostrou que vários isotiocianatos inibiram a germinação e crescimento de *M. anisopliae*, contudo, allyl-isotiocianato e propil-isotiocianato estimularam a germinação e desenvolvimento de apressório no fungo. Hountondji et al. (2006) mostraram que um composto comumente presente em *blends* de voláteis das plantas facilitou a germinação do fungo entomophthorales *Neozygites tanajoae*, aumentando as taxas de mortalidade do ácaro-verde-da-mandioca *Mononychellus tanajoa* (Bondar, 1938) (Acari: Tetranychidae). Estudos sobre interações benéficas de voláteis de plantas na germinação de fungos entomopatogênicos são escassos, não sendo encontrado nenhum trabalho sobre essa interação com *M. rileyi*, abrindo um leque de perguntas para futuras pesquisas.

Outra hipótese para explicar a melhor germinação dos microscleródios sobre as folhas de milho e soja pode ser a interação de fungos de forma endofítica com plantas, um fenômeno amplamente descrito para fungos entomopatogênicos, principalmente do gênero *Metarhizium* spp., que é apontado na literatura como uma possível parte da ancestralidade desses microrganismos (BOOMSMA et al., 2014; St. LEGER; WANG, 2020). Trabalhos mostraram que plantas colonizadas endofiticamente por fungos entomopatogênicos passaram a produzir diferentes compostos secundários (MEIRELLES et al., 2013; GANGE et al., 2019; St LEGER; WANG, 2020) o que poderia ser mais uma evidência da íntima relação ecológica e evolutiva entre fungos entomopatogênicos e plantas. Meirelles et al. (2013) apontaram a capacidade de *M. rileyi* na colonização de *Hypericum polyanthemum* gerando aumento na biomassa da planta e na produção de metabólitos secundários. Zheng et al. (2023) mostraram a capacidade endofítica de vários fungos entomopatogênicos no tomateiro, entre eles *M. rileyi*, que causou promoção de crescimento na planta e mortalidade de até 92,6% na traça-do-tomateiro *Phthorimaea (Tuta) absoluta*.

Em relação ao desempenho de microscleródios de *M. rileyi* sobre a superfície do solo, Marciano et al. (2021), em estudo com microscleródios de *M. robertsii*, relataram que a germinação em ágar-água iniciou somente após 48 horas de incubação e no solo não estéril

apenas 5 dias após incubação. Quanto à conidiógenese, teve início apenas após 5 dias em ágar-água e 7 dias de incubação em solo não estéril. Diante disso, pensando em microescleródios que atingiriam o solo e que lagartas em ínstar final de desenvolvimento de *S. frugiperda* se dirigem a esse ambiente para empupar, os resultados obtidos no presente estudo mostram-se vantajosos, tendo em vista que a germinação tanto em ágar-água quanto em solo não estéril teve início após 24 horas de incubação, com início de esporulação em apenas 72 horas.

Em relação à quantificação de produção de conídios e unidades formadoras de colônia (UFC), que são procedimentos comumente realizados em análises de desempenho de fungos no solo, não foi possível ser feita devido à falta de meios seletivos para *M. rileyi*. Em testes preliminares, inúmeros meios seletivos para hypocreales foram testados, entre eles meios contendo aveia, cristal violeta, os fungicidas dodine e ciclohexamida, antibióticos tetraciclina e estreptomicina (CHASE et al., 1986; STRASSER et al., 1996), sulfato de cobre (BAATH., 1991), brometo de cetrimônio (CTAB) (POSADAS et al., 2012) e associação de cloranfenicol, tiabendazol e ciclohexamida (FERNANDES et al., 2010) contudo, nenhum dos meios testados foi eficiente para o isolado utilizado neste estudo (ESALQ 5611).

A interação positiva de *M. rileyi* com o solo já é descrita há muito tempo, apesar de ser um fungo comumente virulento para lepidópteros desfolhadores, este mantém-se viável no solo por tanto tempo quanto fungos mais intimamente relacionados às pragas de solo (IGNOFFO et al., 1978; DEVI, 1995). Inúmeros fatores que podem afetar o desempenho de fungos entomopatogênicos no solo são discutidos na literatura, como as condições de temperatura e umidade, a presença de uma cobertura vegetal ou não e também a presença de microrganismos antagonísticos, como *Trichoderma* spp. (JACKSON et al., 2000; MICHEREFF et al. 2001; MORA et al., 2016). Apesar disso, os microescleródios de *M. rileyi* apresentaram uma rápida germinação e esporulação, sendo isso uma característica potencial para utilização deste propágulo na superfície do solo.

Diante do exposto, foi constatado que é possível o escalonamento deste propágulo para biorreator de bancada, e a mistura dos microescleródios com terra de diatomáceas proporcionou alta germinação sobre as folhas (principalmente no milho) em ambientes com alta umidade relativa, o que é um ponto positivo pois o objetivo da estratégia é utilizar os microescleródios para controle de *S. frugiperda* no milho. Além disso, foi observada alta germinação desses propágulos na superfície do solo, e partindo da hipótese que parte da formulação aplicada em campo cairá no solo, pode ocorrer esporulação e os conídios atingirem lagartas de último ínstar que estão no solo no estágio de pré-pupa. Apesar da

mistura com a terra de diatomáceas ser capaz de manter a viabilidade próxima de 100% mesmo após 6 meses de armazenamento em refrigeração, outros tipos de aditivos e formulações devem ser testados para otimizar a germinação em ambientes com umidade reduzida, tendo em vista que este é um fator limitante para o desempenho deste propágulo.

## Referências

- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. *In*: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, p. 21 - 37, 1998.
- BAATH, E. Tolerance of copper by entomogenous fungi and the use of copper-amended media for isolation of entomogenous fungi from soil. **Mycological Research**, v. 95, n. 9, p. 1140–1142. doi:10.1016/s0953-7562(09)80562-5 1991
- BEHLE, R. W.; JACKSON, M. A. Effect of fermentation media on the production, efficacy, and storage stability of *Metarhizium brunneum* microsclerotia formulated as a prototype granule. *Journal of Economic Entomology*, v. 107, n. 2, p. 582–590, 2014. <https://doi.org/10.1603/EC13426>
- BOOMSMA, J. J.; JENSEN, A. B.; MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. *Annual Review of Entomology*, v. 59, p. 467, 2014. Doi: 10.1146/annurev-ento-011613-162054
- BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C. Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 43, n. 2, p.288-292, 1984.
- BURRAGE, S.W. The micro-climate at the leaf surface. *In*: PREECE, T. F.; DICKINSON, C. H. **Ecology of leaf surface micro-organisms**. New York: Academic Press, p 91–101, 1971.
- CORY, J. S.; ERICSSON, J. D. Fungal entomopathogens in a tritrophic context. *In*: ROY, H. E.; VEGA, F. E.; CHANDLER, D.; GOETTEL, M. S.; PELL, J.; WAJNBERG, E. **The Ecology of Fungal Entomopathogens**. Springer, Dordrecht, pp. 75 – 88, 2009.
- COSTA, V. H. D.; SOARES, M. A.; RODRÍGUEZ, F. A. D.; ZANUNCIO, J. C.; SILVA, I. M.; VALICENTE, F. H. *Nomuraea rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 98, n. 2, p. 796–798, 2015. Doi:<https://doi.org/10.1653/024.098.0263>
- CHASE, A. R.; OSBORNE, L. S.; FERGUSON, V. M. Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. **The Florida Entomologist**, v. 69, n. 2, p. 285 – 292, 1986. <https://doi.org/10.2307/3494930>
- CHU, C.C.; AKEY, D.H.; HENNEBERRY, T. J. Response of cotton plants to aldicarb soil application. **Journal of the Agricultural Association of China**, v.167, p. 75–90, 1994.
- DEVI, P. S. V. Soil treatment with *Nomuraea rileyi*: A promising technique for the control of *Spodoptera litura* on groundnut. **Biocontrol, Science and Technology**, v. 5, n. 3, 1995. <https://doi.org/10.1080/09583159550039800>

- DEVI, U. K.; REINEKE, A.; RAO, U. C. M.; REDDY, N. R. N.; KHAN, A. P. A. AFLP and single-strand conformation polymorphism studies of recombination in the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Mycological Research**, v. 111, n. 6, p. 716 – 725, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.003>
- ESTEFAN, G.; SOMMER, R.; RYAN, J. **Methods of Soil, Plant, and Water Analysis: A manual for the West Asia and North Africa region**. 3<sup>a</sup> ed. Beirut: International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), 2013.
- FARIA, M.; HOTCHKISS, J. H.; HAJEK, A. E.; WRAIGHT, S. P. Debilitation in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and implication with respect to viability determinations and mycopesticide quality assessments. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, n. 1, p. 74 – 83, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.05.011>
- FERNANDES, E. K. K.; KEYSER, C. A.; RANGEL, D. E. N.; FOSTER, R. N.; ROBERTS, D. W. CTC medium: A novel iodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, v. 54, n. 3, p. 197 – 205, 2010. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.05.009>
- FRONZA, E.; SPECHT, A.; HEINZEN, H.; BARROS, N. M. *Metarhizium (Nomuraea) rileyi* as biological control agent. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 11, p. 1243 – 1264, 2017. doi: 10.1080/09583157.2017.1391175
- GALLARDO, F.; BOETHEL, D. J.; FUXA, J. R.; RICHTER, A. Susceptibility of *Heliothis zea* (Boddie) larvae to *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. **Journal of Chemical Ecology**, v.16, p. 1751–1759, 1990. <https://doi.org/10.1007/BF01020492>
- GANGE ET AL 2019 <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/nph.15859>
- GARDESCU, S.; HAJEK, A. E.; GOBLE, A. T.; JACKSON, M. A. *Metarhizium* microsclerotia and hydrogel versus hydromulch: testing fungal formulations against Asian longhorned beetles. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 8, p. 918 – 930, 2017. doi: 10.1080/09583157.2017.1362546
- GOBLE, T. A.; GARDESCU, S.; FISHER, J. J.; JACKSON, M. A.; HAJEK, A. E. Conidial production, persistence and pathogenicity of hydromulch formulations of *Metarhizium brunneum* F52 microsclerotia under forest conditions. **Biological Control**, v. 95. P. 83 – 93, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.003>
- GOTTI, I. A.; MOREIRA, C. C.; DELALIBERA Jr., I.; LICHT, H. H. D. Blastospores from *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium rileyi* are not always as virulent as conidia are towards *Spodoptera frugiperda* caterpillars and use different infection mechanisms. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1594, 2023. Doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061594>
- HOUNTONDJI, F. C. C.; HANNA, R.; SABELIS, M. W. Does Methyl Salicylate, a component of herbivore-induced plant odour, promote sporulation of the mite-pathogenic fungus *Neozygites tanajoae*? **Experimental & Applied Acarology**, v. 39, p. 63–74, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10493-006-0023-1>
- IGNOFFO, C. M.; GARCIA, C.; HOSTETTER, D. L.; PINNELL, R. E. Stability of conidia of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, in and on soil. **Environmental Entomology**, v. 7, n. 5, p. 724–727, 1978. <https://doi.org/10.1093/ee/7.5.724>

- INYANG, E. N.; BUTT, T.M.; BECKETT, A.; ARCHER, S. The effect of plant growth and topography on the acquisition of conidia of the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* by larvae of *Phaedon cochleariae*. **Mycological Research**, v. 102, n. 11, p. 1365–1374, 1998. <https://doi.org/10.1017/S095375629800673X>
- INYANG, E.; BUTT, T.; DOUGHTY, K.; TODD, A.; ARCHER, S. The effects of isothiocyanates on the growth of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its infection on the mustard beetle. **Mycological Research**, v. 103, n. 8, p. 974 – 980, 1999. <https://doi.org/10.1017/S0953756298007989>
- JACKSON, M. A.; SCHISLER, D. A. Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicidal propagules. **Mycological Research**, v. 99, n. 7, p. 879 – 884, 1995. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80745-4](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80745-4)
- JACKSON, T. A.; ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Success in biological control of soil-dwelling insects by pathogens and nematodes. In: GURR, G.; WRATTEN, S. *Biological Control: Measures of Success*. Dordrecht: Springer, p. 271 – 296, 2000. Doi: [https://doi.org/10.1007/978-94-011-4014-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-94-011-4014-0_9)
- JACKSON, M. A.; JARONSKI, S. T. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological research*, v. 113, n. 8, p. 842 – 850, 2009. doi: 10.1016/j.mycres.2009.03.004
- JACKSON, M. A.; JARONSKI, S. T. Development of pilot-scale fermentation and stabilization processes for the production of microsclerotia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* strain F52. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 8, p. 915 – 930, 2012. doi: 10.1080/09583157.2012.696578
- JARONSKI, S. T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. **BioControl**, v. 55, p. 159–185, 2010. Doi: 10.1007/s10526-009-9248-3.
- JARONSKI, S. T. Mass production of entomopathogenic fungi: state of the art. In: MORALES-RAMOS, J. A.; ROJAS, M. G.; SHAPIRO-ILAN, D. J. (Ed), **Mass Production of Beneficial Organisms**. Elsevier inc., p. 357 – 415, 2014. Doi: 10.1016/B978-0-12-391453-8.00011-X
- JARONSKI, S. T.; JACKSON, M. A. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. **Biocontrol, Science and Technology**, v. 18, n. 8, p. 849 – 863, 2008. Doi: 10.1080/09583150802381144
- KEPLER, R. M.; HUMBER, R. A.; BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. **Mycologia**, v. 106, n. 4, p. 811 – 829, 2014. Doi: <https://doi.org/10.3852/13-319>
- KISH, L. P.; ALLEN, G. E. The biology and ecology of *Nomuraea rileyi* and a program for predicting its incidence on *Anticarsia gemmatilis* in soybean. **Bulletin. Florida Agricultural Experiment Station**, (795), 1978.
- LIRA, A. C. Produção de microescleródios de *Metarhizium* spp. para inoculação de sementes de milho visando o controle de *Spodoptera frugiperda*. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Entomologia) – Universidade de São Paulo / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2019.
- LIRA, A. C.; MASCARIN, G.M.; DELALIBERA Jr., I. Microsclerotia production for dual role as plant biostimulant and control of *Spodoptera frugiperda* through corn seed coating. **Fungal Biology**, v. 124, p. 689-699, 2020. Doi :10.1016/j.funbio.2020.03.011

- MARCIANO, A.F.; MASCARIN, G.M.; FRANCO, R.F.F.; GOLO, P. S.; JARONSKI, S. T.; FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Innovative granular formulation of *Metarhizium robertsii* microsclerotia and blastospores for cattle tick control. **Scientific Reports**, v. 11, n. 4972, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84142->
- MASCARIN, G. M.; KOBORI, N. N.; JESUS VITAL, R. C.; JACKSON, M. A.; QUINTELA, E.D. Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.30, p.1583-1590, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1581-0>
- MASCARIN, G. M.; LOPES, R. B.; DELALIBERA, I. Jr., FERNANDES, E. K. K.; LUZ, C.; FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 165, p. 46 – 53, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.001>
- MEDEIROS, A. C. S. **Preparo e uso de soluções salinas saturadas para a caracterização fisiológica de sementes florestais**. Colombo: Embrapa – Circular técnica 125, 2006.
- MEIRELLES, G.; PINHATTI, A. V.; SOSA-GOMEZ, D.; ROSA, L. M. G.; RECH, S. B.; POSER, G. L. V. Influence of fungal elicitation with *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson in the metabolism of acclimatized plants of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Guttiferae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 112, p. 379 – 385, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0234-6>
- MICHEREFF, S. J.; PERUCH, L. A. M.; ANDRADE, D. E. G. T. Manejo sustentável de doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, p. 15 – 69, 2001.
- MORA, M. A. E.; CASTILHO, A. M. C. C.; FRAGA, M. E. Fungos entomopatogênicos: Enzimas, toxinas e fatores que afetam a diversidade. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 18, n. 3, p. 335 – 349, 2016.
- MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D. R. A Case Study in Biological Control: Soybean Defoliating Caterpillars in Brazil. **International Crop Science**, p. 115 – 119, 1993. <https://doi.org/10.2135/1993.internationalcropscience.c20>
- PAIXÃO, F.; HUARTE-BONNET, C.; RIBEIRO-SILVA, C. D.; MASCARIN, G. M.; FERNANDES, E. K. K.; PEDRINI, N. Tolerance to abiotic factors of microsclerotia and mycelial pellets from *Metarhizium robertsii*, and molecular and ultrastructural changes during microsclerotial differentiation. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 2, 2021. doi: 10.3389/ffunb.2021.654737
- POSADAS, J. B.; COMERIO, R. M.; MINI, J. I.; NUSSENBANUM, A. L.; LECUONA, R.E. A novel dodine-free selective medium based on the use of cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) to isolate *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* sensu lato and *Paecilomyces lilacinus* from soil. **Mycologia**, v. 104, n. 4, p. 974- 980, 2012. doi: 10.3852/11-234
- QIN, L.; LIU, X.; LI, J.; CHEN, H.; YAO, Q.; YANG, Z.; CHEN, K. Protein profile of *Nomuraea rileyi* spore isolated from infected silkworm. **Current Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 578–585, 2009. doi:10.1007/s00284-009-9374-2
- ROCKLAND, L. B. Saturated salt solutions for static control of relative humidity between 5° and 40° C. **Analytical Chemistry**, n. 32, v. 10, p. 1375 – 1376, 1960. <https://doi.org/10.1021/ac60166a055>

- RODRIGUES, J.; CATÃO, A. M. L.; DOS SANTOS, A. S.; PAIXÃO, F. R. S.; SANTOS, T. R.; MARTINEZ, J. M.; MARRETO, R. N.; MASCARIN, G. M.; FERNANDES, E. K. K.; HUMBER, R. A.; LUZ, C. Relative humidity impacts development and activity against *Aedes aegypti* adults by granular formulations of *Metarhizium humberi* microsclerotia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 7, p. 2725-2736, 2021. doi: 10.1007/s00253-021-11157-6.
- SONG, Z.; YIN, Y.; JIANG, S.; LIU, J.; CHEN, H.; WANG, Z. Comparative transcriptome analysis of microsclerotia development in *Nomuraea rileyi*. **BMC genomics**, v. 14, n. 411, p. 1- 9, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-411>
- SONG, Z.; YIN, Y.; JIANG, S.; LIU, J.; WANG, Z. Optimization of culture medium for microsclerotia production by *Nomuraea rileyi* and analysis of their viability for use as mycoinsecticide. **Biocontrol**, v. 59, n. 5, p. 597-605, 2014. Doi: 10.1007/s10526-014-9589-4
- SONG, Z.; LIN, Y.; DU, F.; YIN, Y.; WANG, Z. Statistical optimization of process variables and large-scale production of *Metarhizium rileyi* (Ascomycetes: Hypocreales) microsclerotia in submerged fermentation. **Mycology**, v. 8, n. 1, p. 39-47, 2017. Doi: 10.1080/21501203.2017.1279688
- St. LEGER, R. J.; WANG, J. B. *Metarhizium*: jack of all trades, master of many. **Open Biology**, v. 10, n. 12, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1098/rsob.200307>
- STRASSER, H.; FORER, A.; SCHINNER, F. Development of media for the selective isolation and maintenance of virulence *Beauveria brongniartii*. In: **3<sup>rd</sup> International Workshop on Microbial Control of Soil Dwelling Pests**, New Zeland: Lincoln, p. 21 – 23, 1996.
- TAKESHITA, S.; JANKOWSKY, I. P. Reduction in dimensional changes of Jatobá (*Hymenaea* sp.) and Muiracatiara (*Astronium* sp.) submitted to additional heat treatment. **Scientia Florestalis**, v. 43, n. 106, p. 345 – 352, 2015.
- THAKRE, M.; THAKUR, M.; MALIK, N.; GANGER, S. Mass scale cultivation of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* using agricultural products and agro wastes. **Journal of Biopesticides**, v. 4, n. 4, p. 176 – 179, 2011.
- UGINE, T. A.; WRAIGHT, S. P.; SANDERSON, J. P. A tritiphic effect of host plant on susceptibility of western flower thrips to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, n. 2, p. 162 – 172, 2007. Doi: 10.1016/j.jip.2007.05.004
- VEGA, F. E.; DOWD, P. F.; MCGUIRE, M. R.; NELSEN, T. C. In vitro effects of secondary plant compounds on germination of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.70, n.3, p. 209–213, 1997. Doi: 10.1006/jipa.1997.4693.
- VILLAMIZAR, L. F.; NELSON, T. L.; JONES, S. A.; JACKSON, T. A.; HURST, M. R. H.; MARSHALL, S. D. G. Formation of microsclerotia in three species of *Beauveria* and storage stability of a prototype granular formulation. **Biocontrol, Science and Technology**, v. 28, n. 12, p. 1097-1113, 2018. Doi: 10.1080/09583157.2018.1514584
- YOUSEF-YOUSEF, M.; ROMERO-CONDE, A.; QUESADA-MORAGA, E.; GARRIDO-JURADO, I. Production of microsclerotia by *Metarhizium* sp., and factors affecting their survival, germination, and conidial yield. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 4, p. 402, 2022. Doi: <https://doi.org/10.3390/jof8040402>

ZHENG, Y.; LIU, Y.; ZHANG, J.; LIU, X.; JU, Z.; SHI, H.; MENDOZA-MENDOZA, A.; ZHOU, W. Dual role of endophytic entomopathogenic fungi: induce plant growth and control tomato leafminer *Phthorimaea absoluta*. **Pest Management Science**, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.7657>





#### 4 EFICIÊNCIA DE MICROESCLERÓDIOS DE *Metarhizium rileyi* (HYPOCREALES: CLAVICIPITACEAE) NO MANEJO DE *Spodoptera frugiperda* (SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM DIFERENTES HABITATS

##### Resumo

A lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das principais pragas do milho, causando graves danos a produção. *Metarhizium rileyi* é um fungo entomopatogênico muito conhecido por sua alta virulência principalmente à família Noctuidae, sendo assim um fungo promissor para o controle de *S. frugiperda*. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar uma nova estratégia a partir da utilização de microescleródios (MS) de *M. rileyi* para o controle de *S. frugiperda* em diferentes habitats do seu ciclo de vida (folhas estendidas, solo e cartucho). Os MS utilizados nos experimentos foram produzidos através de fermentação líquida em frascos, com inóculo de 10% de pré-cultura e incubados em shaker durante 4 dias. Em seguida, MS foram formulados com terra de diatomáceas em uma concentração  $1 \times 10^5$  MS/g. Foram conduzidos testes em laboratório, comparando tratamentos com conídios (pulverização na concentração  $1 \times 10^7$  conídios/mL) e microescleródios (0,02 g de MS formulados sobre folhas, produzindo aproximadamente  $1 \times 10^7$  conídios) em lagartas de 3º ínstar e no solo. Diferentes proporções de mistura contendo MS (0,02g e 0,04) foram aplicados sobre o solo natural e o efeito destes em lagartas de 5º instar foi avaliado. Em casa de vegetação, foram realizados testes comparativos entre conídios em microescleródios em plantas V3 de milho, sendo avaliado além da mortalidade, a biomassa das plantas ao final do experimento. Em laboratório, MS aplicados sobre folhas de milho geraram taxa de mortalidade total mais alta e mais rápida, alcançando uma média de 44,4% de mortalidade em três dias e 95% de mortalidade ao final, sendo estatisticamente mais rápido que a pulverização de conídios. Contudo, o tratamento com MS obteve apenas 2,5% de mortalidade confirmada. Os MS também tiveram ótimo desempenho quando aplicados sobre o solo, alcançando mortalidade total de 85% em dez dias. Em casa de vegetação, devido a baixa umidade relativa, a estratégia não mostrou eficiência, sendo que o tratamento com MS obteve taxas de mortalidade muito baixas. A estratégia mostrou-se muito promissora em bioensaios de laboratório, entretanto, mais estudos em campo são necessários para otimizar a germinação em microambientes com menores umidades através de diferentes formulações.

**Palavras-chave:** Fungos entomopatogênicos; Lagarta-do-cartucho-do-milho; Virulência; Controle Biológico.

#### EFFICIENCY OF *Metarhizium rileyi* (HYPOCREALES: CLAVICIPITACEAE) MICROSCLEROTIA TO CONTROL *Spodoptera frugiperda* (SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) IN DIFFERENT HABITATS

##### Abstract

The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), is currently the major maize pest, causing significant qualitative and quantitative losses. *Metarhizium rileyi* is an entomopathogenic fungus known for its high virulence to Noctuidae family and also a promising microorganism to control the fall armyworm. The main goal of this study was to evaluate a new strategy: the use of microsclerotia (MS) of *M. rileyi* to

control *S. frugiperda* at different habitats of its life cycle (leaves, soil, and whorl). The MS used in experiments were produced through submerged liquid fermentation in flasks, with inoculation of 10% pre-culture and incubated in orbital shaker during 4 days (28 °C; 300 rpm; 12 h daylight). After that, MS were formulated with diatomaceous earth at of  $1 \times 10^5$  MS/g concentration. Laboratory bioassays were conducted comparing treatments involving aerial conidia (sprayed at a concentration of  $1 \times 10^7$  conidia/mL) and microsclerotia (0,02 g of formulated MS on leaves, resulting in approximately  $1 \times 10^7$  conidia) on 3<sup>rd</sup> instar caterpillars, as well as on soil, comparing different quantities of MS formulations (0,02g and 0,04g) applied on natural soil and its effect on 5<sup>th</sup> instar larvae were also assessed. Additionally, experiments were conducted in a greenhouse to evaluate conidia and MS treatments on V3 stage of maize plants, in which we evaluated mortality taxes and biomass of the plants at the end of the bioassay. In the laboratory, MS on maize leaves showed high and fast mortality, reaching an average of 44,4% mortality within three days and 95% total mortality, statistically faster than conidial spray. The MS also performed well in soil, reaching a total mortality of 85% in ten days. In the greenhouse, despite low germination and infection due to low humidity (which is shown as a limiting factor in the performance of these microorganisms), the dry biomass of plants treated with MS was higher, indicating a reduction in phytophagy or even the hypothesis of an endophytic relation between *M. rileyi* and maize. However, further studies are needed to optimize germination in the field through different formulations.

**Keywords:** Entomopathogenic fungi; Fall armyworm; Virulence; Biological Control.

#### 4.1 Introdução

Atualmente na cultura do milho, a lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada uma das principais pragas da cultura, causando danos em todos os estágios fenológicos da planta e podendo levar a planta à morte (GRÜTZMACHER, et al., 2000; VALICENTE, 2015). O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de milho, com uma produção estimada de 125.062,4 milhões de toneladas de milho no ano safra 2022/23 (CONAB), e *S. frugiperda* pode acarretar grande impacto econômico para os produtores do país, danificando plantas, afetando a produção e até mesmo o produto final.

Além do seu hábito alimentar voraz e polífago, o problema de desenvolvimento de resistência em *S. frugiperda* também é evidente, com muitas populações já resistentes às principais tecnologias de controle do mercado, como sementes geneticamente modificadas (tecnologia *bt*) (FARIAS et al., 2014; BURTET et al., 2017; FATORETTO et al., 2017) e aos principais grupos de moléculas químicas como benzoilureias, piretroides e organofosforados (DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001; NASCIMENTO et al., 2016; GARLET et al., 2021). Diante disso, a pesquisa para desenvolvimento de alternativas biológicas é essencial, para que através da associação de bioprodutos e outras estratégias seja possível um programa de manejo efetivo desta praga.

Na literatura existem muitos trabalhos descrevendo epizootias naturais causadas pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) em lagartas no campo, demonstrando seu potencial de controle para esse grupo de insetos (ALLEN et al., 1971; ALVES, 1998; COSTA et al., 2015; FRONZA et al., 2017). *M. rileyi* é descrito como um entomopatógeno especialista, diferentemente da maioria das outras espécies do gênero *Metarhizium*, sendo maior a virulência a lagartas da família Noctuidae (MOSCARDI; SOSA-GÓMEZ, 1993; ALVES, 1998; FRONZA et al., 2017). *M. rileyi* é um fungo promissor para o controle de *S. frugiperda*, contudo a seleção de isolados que produzam conídios em larga escala deste fungo é desafiadora, devido a suas exigências nutricionais, ambientais e instabilidade genética dos isolados (EDELSTEIN et al., 2004; THAKRE et al., 2011; SONG et al., 2013). No Brasil, Faria et al. (2021) selecionaram um isolado de *M. rileyi* altamente virulento e alcançaram uma produção de  $1,3 \times 10^9$  conídios por grama de arroz. Pensando nisso, o estudo de propágulos produzidos através de fermentação líquida podem ser uma alternativa para o desenvolvimento de um novo bioproduto de *M. rileyi* para controle de *S. frugiperda*.

Microescleródios são estruturas de resistência que consistem em aglomerados de hifas que produzem melanina e possuem uma reserva nutricional endógena, e assim, em condições favoráveis, germinam e produzem conídios infectivos (ZHONG et al., 2008; JACKSON; JARONSKI, 2009). Estas estruturas podem ser induzidas através da fermentação líquida em fungos entomopatogênicos, entre eles *M. rileyi*, como apontado por Song et al. (2013). O isolado ESALQ 5611 de *M. rileyi* foi utilizado em estudos prévios comparando atividade de conídios e blastosporos em *S. frugiperda* e apresentou alta virulência, com melhores resultados para os conídios aéreos (GOTTI et al., 2023). Como apontado no primeiro capítulo deste trabalho, este isolado foi capaz de produzir microescleródios em shaker e em biorreator de bancada, sendo que estes propágulos germinaram bem mesmo após secagem e em vários microclimas. Diante disso, o objetivo deste estudo é avaliar se microescleródios de *M. rileyi* podem vir a ser uma alternativa para controle de *S. frugiperda*, por meio de bioensaios de mortalidade em laboratório e casa de vegetação.

## **4.2 Materiais e Métodos**

### **4.2.1 Criação de *S. frugiperda* em laboratório**

Os insetos foram criados em laboratório, sendo alimentados com dieta artificial segundo Greene et al. (1976). Devido ao hábito canibal, as lagartas foram isoladas em copos

plásticos de 100 mL com tampa. No estágio de pupa, foram transferidas para uma placa de Petri e postas em gaiolas confeccionadas de PVC (policloreto de vinila) (altura 24 cm e diâmetro 14,5 cm) com placas de acrílico em ambas extremidades para evitar a saída dos insetos adultos. Os adultos foram alimentados com solução de mel 10% e a postura dos ovos feita em papel A4 branco posicionado nas paredes da gaiola e substituído diariamente. Para os insetos utilizados nos bioensaios, os ovos foram coletados e transferidos para dieta natural (fragmentos de folha de milho não transgênicos) e as lagartas mantidas nessa condição até alcançarem o ínstar de interesse (3º ínstar para bioensaios em folhas e 5º ínstar para bioensaios em solo).

#### **4.2.2 Bioensaios de laboratório**

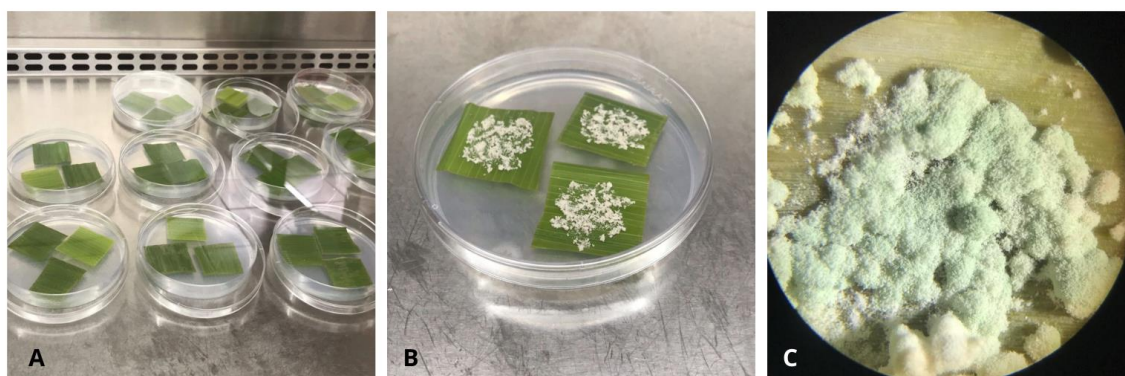
Para os bioensaios de virulência de *M. rileyi* em *S. frugiperda*, foram considerados diferentes contextos em que esses propágulos poderiam atingir a lagarta em seus estágios de desenvolvimento, e levando em consideração os danos nas plantas de milho. Sendo assim, foi testada a ação de microescleródios nas folhas do milho, no solo e em plantas em laboratório e casa de vegetação.

##### **4.2.2.1 Ação de microescleródios de *M. rileyi* em *S. frugiperda* sobre folhas de milho**

Para verificar a ação de contato dos microescleródios em lagartas sobre a folha do milho, foram testados 5 tratamentos: controle contendo somente água destilada (T1), controle com silweet (0,02%) (T2), controle negativo contendo 0,02 g de terra de diatomáceas (T3), suspensão de conídios aéreos ( $1 \times 10^7$  conídios/mL) com aplicação na folha seguido do posicionamento da lagarta em cima da folha (T4) e pulverização diretamente na lagarta (T5), mistura microescleródios + terra de diatomáceas 0,02 g ( $1 \times 10^5$  MS/g) (T6). Optou-se pela comparação com conídios aéreos pois são os propágulos comumente mencionados na literatura. Também optou-se por testar a pulverização dos conídios na folha seguido do posicionamento da lagarta sobre esta folha (T4) para comparar a ação de contato da lagarta com os conídios e com os microescleródios esporulados (T6).

Para a aplicação dos microescleródios nas folhas, quadrados de milho não transgênico (3 cm x 3 cm) foram recortados e submetidos a procedimento de esterilização externa através da imersão durante 15 minutos em hipoclorito de sódio, seguido de álcool

70% e água destilada e por fim, exposição durante 15 minutos a luz UV. As folhas foram posicionadas em placas de Petri com ágar-água (3 folhas por placa) e 0,02 grama de mistura com microescleródios foi aplicado sobre as folhas e em seguida, as placas foram incubadas em BOD ( $26 \pm 2$  °C; 12 h fotofase) durante 4 dias antes do experimento para permitir a germinação e esporulação dos propágulos. Após esse período, as folhas foram individualizadas em placas de Petri menores e uma lagarta foi colocada sobre cada folha (Figura 14), sendo realizadas 4 repetições de 10 insetos. Em experimentos prévios observou-se que a mistura MS+TD ( $1 \times 10^5$  MS/g) produziu aproximadamente  $5 \times 10^8$  conídios/g em 96h sobre folha de milho em UR 95-100 %, portanto para obter-se um valor próximo de  $1 \times 10^7$  conídios, foi aplicado 0,02 g dessa mistura.



**Figura 14.** Folhas de milho (3 x 3 cm) esterilizadas externamente e posicionadas sobre o ágar-água (A); Aplicação de 0,02 g de mistura contendo microescleródios e terra de diatomáceas sobre as folhas (B); Microescleródios esporulados sobre a folha de milho após 4 dias de incubação (C).

Para testemunhas e pulverização de conídios, o N amostral foi 40, sendo 10 lagartas individualizadas em 4 placas de Petri (90 x 15 mm) e os tratamentos aplicados em torre de Potter, sendo aplicados 2 mL por repetição. No tratamento de pulverização das folhas seguido do posicionamento das lagartas sobre estas, o mesmo procedimento de corte (3 cm x 3 cm) e esterilização externa das folhas foi realizado, seguido da pulverização (3 folhas por placa de Petri, Figura 1) e então as lagartas foram colocadas sobre as folhas. Realizou-se a quantificação de conídios que atingiram as folhas e a placa de Petri onde as lagartas foram colocadas e para isso, um número extra de folhas foram recortadas, submetidas à esterilização externa e pulverizadas (2 mL de suspensão a  $1 \times 10^7$  conídios/mL). Em seguida foram individualizadas em tubos falcon e lavadas em Tween 0,05% para quantificação dos conídios, totalizando uma média de  $4,7 \times 10^5$  conídios em cada folha. Para quantificação das placas onde as lagartas foram posicionadas para aplicação do tratamento, placas de Petri estéreis e sem nenhum

conteúdo foram pulverizadas (2 mL de suspensão a  $1 \times 10^7$  conídios/mL), aplicou-se 6 mL de Tween 0,05% dentro da placa, esta foi agitada e então o líquido foi recoletado para quantificação, totalizando  $5,1 \times 10^5$  conídios em cada placa.

Nos tratamentos com fungo (microescleródio ou suspensão de conídios), os insetos foram mantidos em contato com o propágulo durante 24 horas, e em seguida transferidos para bandejas contendo 32 células individuais, alimentados com dieta natural (folhas de milho) e avaliados diariamente durante 10 dias. As lagartas foram posicionadas sobre os microescleródios já esporulados para um experimento de prova de conceito e os microescleródios não devem ser aplicados esporulados no campo. As lagartas mortas foram coletadas e submetidas ao processo de esterilização externa (hipoclorito de sódio, álcool 70 % e água destilada) e acondicionadas em câmara úmida (UR 100%) para confirmação do agente causal da morte.

#### **4.2.2.2 Ação de microescleródios de *M. rileyi* aplicados sobre o solo em *S. frugiperda***

O experimento teve como objetivo avaliar a ação de microescleródios na superfície do solo em lagartas de 5º ínstar de *S. frugiperda*, tendo em vista que neste ponto de ciclo de vida a lagarta se dirige ao solo para empupar. Para isso, em placas de Petri (15 x 60 mm) foram pesados 10 g de solo não estéril, peneirado e ajustados para 15% de capacidade de campo (JACKSON; JARONSKI, 2009), sendo cada placa considerado uma repetição contendo uma lagarta. O solo foi avaliado quanto a capacidade de campo pelo método gravimétrico descrito por Estefan, Sommer e Ryan (2013), por meio da saturação do solo e cálculo do teor de água retido através de dados de peso do solo úmido e solo seco. Em seguida, 0,04 g e 0,02 g da mistura MS + TD ( $1 \times 10^5$  MS/g) foram pesados, sendo 30 repetições para cada e aplicados nas placas contendo solo. As placas foram posicionadas em contêineres fechados contendo algodão embebido em água destilada, gerando uma umidade próxima de 100% e acondicionados em BOD ( $26 \pm 2$  °C; 12 h fotofase) durante 4 dias para germinação e esporulação dos microescleródios. Após esse período, uma lagarta de 5º ínstar foi colocada em cada placa contendo a mistura com microescleródios (N = 30), sendo o controle a placa contendo apenas o solo e a lagarta. O experimento foi avaliado diariamente durante 10 dias e as lagartas alimentadas com dieta natural (folha de milho não-transgênico). As lagartas mortas foram coletadas e submetidas ao processo de esterilização externa (hipoclorito de sódio, álcool 70 % e água destilada) e acondicionadas em câmara úmida (UR 100%) para confirmação do agente causal da morte.

#### 4.2.3 Ação de microescleródios de *M. rileyi* em *S. frugiperda* em casa de vegetação

Para verificar a ação de contato dos microescleródios em lagartas em casa de vegetação, foram testados os seguintes tratamentos: controle (não sendo aplicado nada sobre a planta) (T1), controle negativo (sendo aplicado apenas terra de diatomáceas nas plantas) (T2), mistura MS + terra de diatomáceas 0,07 g ( $1 \times 10^5$  MS/g) aplicados 4 dias antes do posicionamento da lagarta (T3), mistura MS + terra de diatomáceas 0,07 g ( $1 \times 10^5$  MS/g) aplicados no dia do posicionamento da lagarta (T4) e suspensão de conídios aéreos ( $1 \times 10^7$  conídios/mL) (T5). O valor 0,07 g de mistura de microescleródios foi definido para aplicação considerando a quantidade de conídios que viriam a ser produzidos pelos microescleródios em relação concentração de conídios aplicados no tratamento de pulverização (3 mL de suspensão a  $1 \times 10^7$  conídios/mL). Foram montados 15 vasos para cada tratamento, cada vaso contendo 2 lagartas de 3º ínstar de *S. frugiperda*. O experimento foi repetido duas vezes no tempo.

A primeira etapa do bioensaio foi o cultivo do milho. Foram semeadas sementes não transgênicas em 75 vasos de 1 L e adubados a cada 10 dias com adubo Nitrogênio – Fósforo – Potássio (NPK) nas concentrações 04-14-08. O estágio fenológico utilizado nos experimentos foi V3, o que levou aproximadamente 15 – 18 dias a partir do momento da germinação da semente.

No processo de montagem do bioensaio, a aplicação da mistura com microescleródios foi feita com uma peneira, para espalhamento mais uniforme na planta, e a aplicação foi mais concentrada na região do cartucho (Figura 15). O mesmo procedimento foi feito para aplicação do controle negativo (T2), com a terra de diatomáceas. Após a aplicação dos tratamentos na planta, duas lagartas de 3º ínstar foram posicionadas em cada planta, e um tecido *voal* foi utilizado para recobrir a planta e o vaso para prevenir o desaparecimento das lagartas, e para que o *voal* não pressione a planta, palitos de madeira foram fixados no solo ao redor da planta. Quanto ao tratamento de pulverização de conídios, primeiramente foram adicionadas as lagartas na planta e em seguida foi pulverizado 3 mL de suspensão de conídios a  $1 \times 10^7$  conídios/mL sobre a planta e as lagartas. Os vasos foram acondicionados em casa de vegetação com temperatura e umidade monitorados através de *data loggers*. A avaliação foi realizada diariamente durante 10 dias e em seguida, as lagartas ou pupas foram transferidas para bandejas e avaliadas por mais 5 dias em laboratório.





**Figura 15.** Aplicação da mistura de microescleródios + terra de diatomáceas (MS + TD) com uma peneira em plantas de milho (A), espalhamento uniforme da mistura na planta (B) e acondicionamento de plantas contendo tratamento + lagartas em casa de vegetação (C).

#### 4.2.4 Análise estatística

Todos os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene ou Bartlett), e quando os pressupostos foram atendidos, utilizou-se o teste Repeated Measures ANOVA para dados repetidos no tempo e One-Way ANOVA para dados sem variação no tempo. Quando não atendidos, utilizou-se de transformações (raiz quadrada, raiz cúbica e logarítmica), modelos lineares generalizados (GLM) ou análises não-paramétricas (Kruskal-Wallis). As análises foram realizadas nos softwares R (R CORE TEAM, 2023) e Software Statistica® versão 10.0 (STATSOFT, 2011).

Para análise do experimento de mortalidade sobre folhas em laboratório, a análise da mortalidade total e confirmada foi realizada utilizando um modelo linear generalizado misto com uma distribuição binomial, fixando o fator “ensaio” como um efeito aleatório. A comparação de médias foi realizada através do método Sidak por ser uma análise com múltiplas comparações. Na análise de sobrevivência, utilizou-se a distribuição Weibull com comparações através do teste log-rank a 5% de significância.

Na análise de mortalidade total e confirmada no bioensaio com lagartas de 5º ínstar sobre o solo e experimento em casa de vegetação, os dados atenderam os pressupostos da ANOVA e, portanto, foram analisados pelo teste One-Way ANOVA seguido do teste de acompanhamento Tukey a 5% de significância. Na análise de sobrevivência, utilizou-se distribuição Weibull com comparações através do teste log-rank a 5% de significância. Para análise de biomassa úmida e seca das plantas ao final do experimento, utilizou-se transformação raiz cúbica ( $\sqrt[3]{x}$ ) seguido da análise através do teste One-Way ANOVA com comparação de médias por Tukey HSD a 5% de significância.

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Ação de microescleródios de *M. rileyi* em *S. frugiperda* sobre folhas de milho

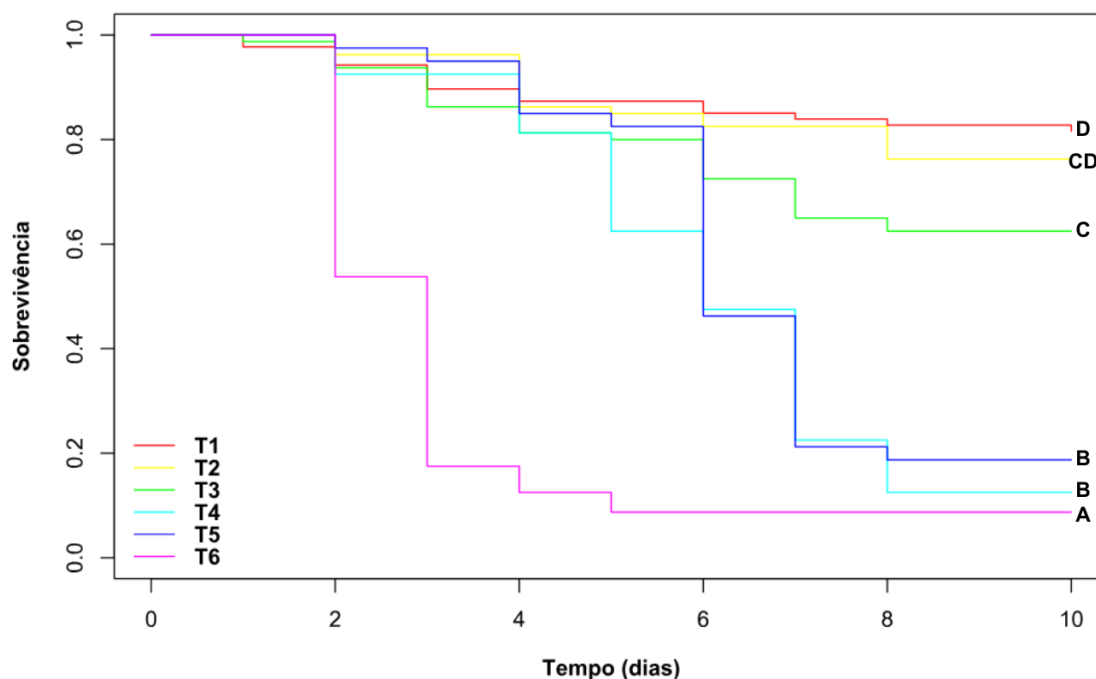
Em relação a análise de mortalidade de lagartas de 3º ínstar em laboratório, não houve diferença estatística entre os tratamentos com pulverização de conídios (nas folhas  $87,5 \pm 12,8\%$ ; nos insetos  $85 \pm 16,0\%$ ) e aplicação de microescleródios ( $95 \pm 10,7\%$ ) ao final do bioensaio. Também foi possível observar uma mortalidade significativamente maior no controle com somente terra de diatomáceas ( $46,2 \pm 26,1\%$ ) em relação aos outros controles (água destilada  $18,7 \pm 18,8\%$ ; silweet 0,02%  $27,5 \pm 14,9\%$ ). Observou-se que os tratamentos com conídios totalizaram um maior número de insetos esporulados (pulverização nas folhas  $52,5 \pm 5\%$ ; pulverização nos insetos  $50,5 \pm 5,7\%$ ), enquanto o tratamento com microescleródios apresentou uma taxa muito baixa de confirmação ( $2,5 \pm 5\%$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Mortalidade total e confirmada (%) de lagartas de 3º ínstar de *S. frugiperda* expostas a conídios e microescleródios esporulados de *M. rileyi* aplicados em folhas de milho em laboratório.

<b>Tratamento</b>	<b>Mortalidade total (%)</b>	<b>Mortalidade confirmada (%)</b>
<b>Água destilada (T1)</b>	$18,75 \pm 18,85$ A	0 C
<b>Silweet (0,02%) (T2)</b>	$27,5 \pm 14,88$ AB	0 C
<b>Controle terra de diatomácea (T3)</b>	$46,25 \pm 26,15$ B	0 C
<b>Pulverização de conídios nas folhas (T4)</b>	$87,5 \pm 12,82$ C	$52,5 \pm 5$ A
<b>Pulverização de conídios nos insetos (T5)</b>	$85 \pm 16,03$ C	$50,5 \pm 5,77$ A
<b>Microescleródio + Terra de diatomácea (T6)</b>	$95 \pm 10,69$ C	$2,5 \pm 5$ B

Média ( $\pm$  desvio padrão), letras diferentes na coluna indicam diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Em análise das curvas de sobrevivência (Figura 16) é evidente que o contato das lagartas de 3º ínstar com microescleródios esporulados gerou mortalidade mais rápida do que a pulverização direta sobre estas ou sobre o contato com as folhas pulverizadas. No tratamento T6 (MS + TD), a curva de sobrevivência cai de forma drástica no terceiro dia (55,6% sobrevivência), enquanto no tratamento T5 a curva de sobrevivência passa a cair apenas a partir do sexto dia (53,2% sobrevivência) e no tratamento T4 (pulverização sobre a folha), a curva cai de forma uniforme ao longo dos dias (47,6% sobrevivência no sexto dia) (Figura 16).



**Figura 16.** Sobrevivência de lagartas de 3º ínstar de *S. frugiperda* submetidas aos tratamentos de água destilada (T1), silweet 0,02% (T2), controle com terra de diatomáceas (T3), pulverização de conídios de *M. rileyi* nas folhas (T4), pulverização de conídios de *M. rileyi* nos insetos (T5) e microescleródios esporulados (T6). Análise de sobrevivência com distribuição Weibull e comparações através do teste log-rank ( $p < 0,05$ ).

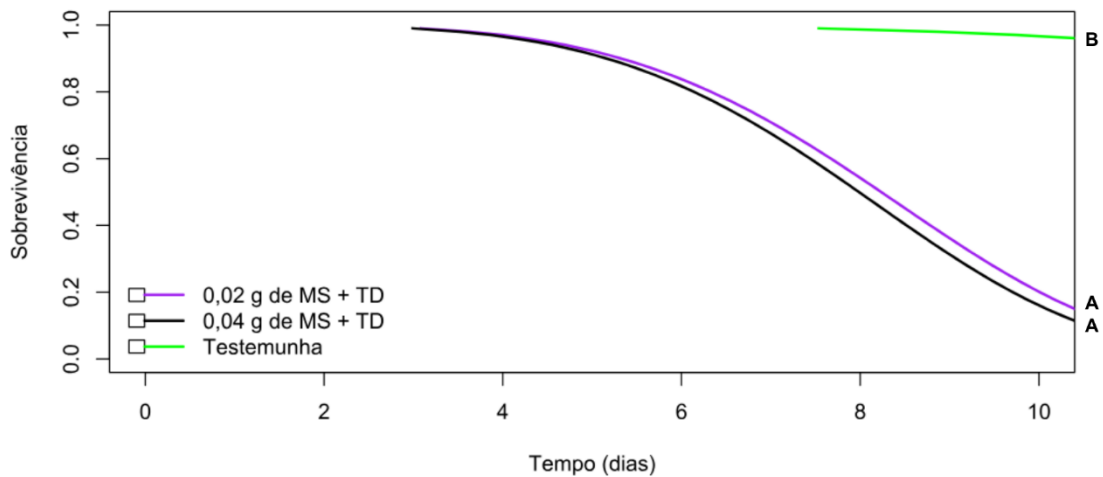
#### 4.3.2 Infecção de *S. frugiperda* por microescleródios esporulados de *M. rileyi* sobre o solo em laboratório

A infecção das lagartas por microescleródios distribuídos no solo obtiveram resultados satisfatórios, com lagartas de 5º ínstar mortas e esporuladas (Figura 18) a partir do 5º dia de avaliação. Após 10 dias de experimento, obteve-se mortalidade acima de 80% para ambas as concentrações de mistura TD + microescleródios aplicadas no solo ( $F = 32,554$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0,001$ ) (Tabela 6, Figura 17).

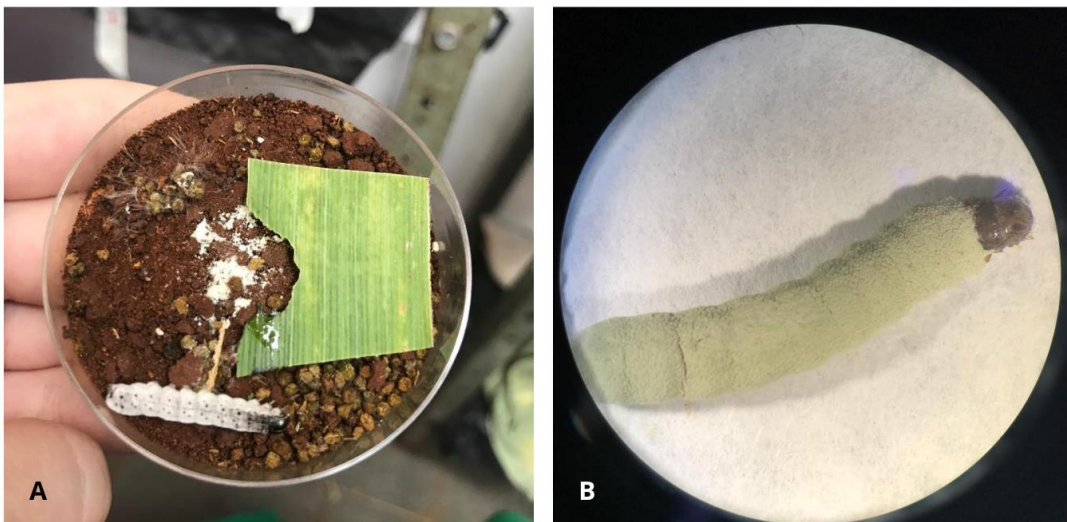
**Tabela 6.** Mortalidade total e confirmada (%) de lagartas de 5º ínstar de *S. frugiperda* expostas a diferentes concentrações de mistura TD + microescleródios esporulados de *M. rileyi* no solo em laboratório.

Tratamento	Mortalidade total (%)	Mortalidade confirmada (%)
<b>0,02 g de MS+TD</b>	82,2 ± 22,72 <b>A</b>	37,7 ± 15,03 <b>A</b>
<b>0,04 g de MS+TD</b>	85,5 ± 8,40 <b>A</b>	38,8 ± 15,03 <b>A</b>
<b>Controle</b>	3,33 ± 3,33 <b>B</b>	1,11 ± 1,92 <b>B</b>

Média ( $\pm$  desvio padrão), letras diferentes na coluna indicam diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 17.** Sobrevivência ao longo do tempo de lagartas de 5º ínstar de *S. frugiperda* submetidas a tratamentos com microescleródios de *M. rileyi* esporulados no solo. Análise de sobrevivência com distribuição Weibull e comparações através do teste log-rank ( $p < 0,05$ ).

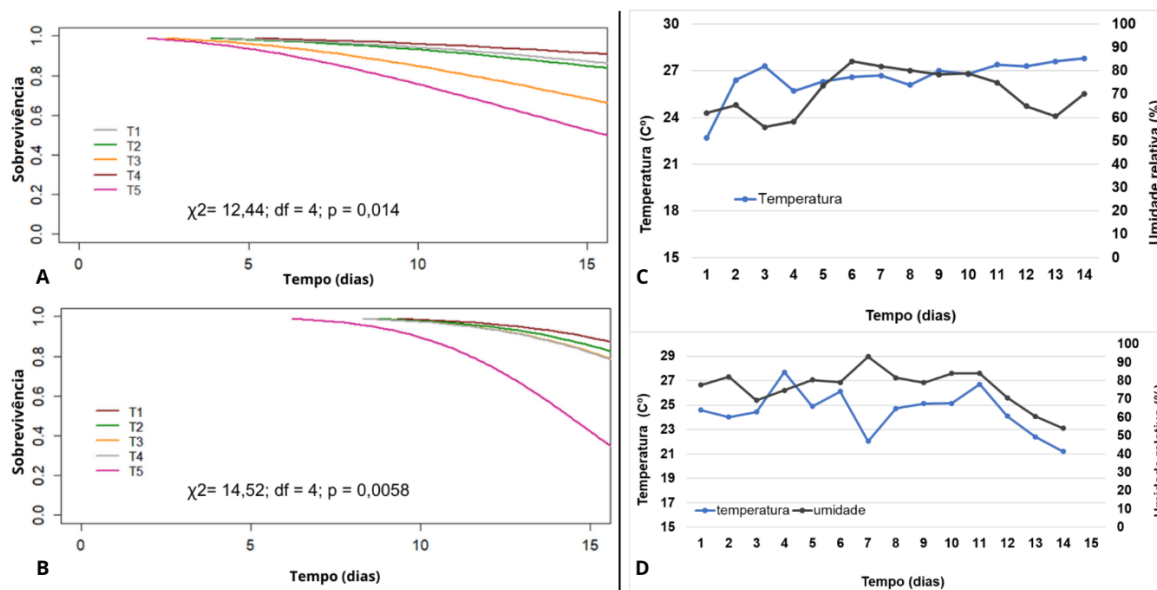


**Figura 18.** Lagarta de 5º ínstar encontrada coberta por micélio de *M. rileyi* durante avaliação de experimento em solo (A) e lagarta de 5º ínstar esporulada por *M. rileyi* durante processo de confirmação da mortalidade em experimento sobre o solo (B).

#### 4.3.3 Ação de microescleródios de *M. rileyi* em *S. frugiperda* em casa de vegetação

Quando realizada a análise de sobrevivência, as curvas apontaram diferença nas diferentes repetições do experimento no tempo, portanto, as análises estão apresentadas de forma separada, assim como os dados de temperatura e umidade em cada experimento. Na primeira repetição do experimento, no tratamento T3 (aplicação prévia de MS + TD), foi observado no último dia de avaliação uma estimativa de mortalidade de  $26,6\% \pm 20,8\%$  (nenhum inseto confirmado) enquanto na segunda repetição, a estimativa foi de  $13,3\% \pm 23\%$

(mortalidade confirmada 25%) (Figura 19 a e b). Outro tratamento que apresentou diferença entre as duas repetições foi o T5 (pulverização direta de conídios), sendo que na primeira repetição a estimativa de sobrevivência foi 52,5% (mortalidade confirmada foi 12,5%) e na segunda repetição, 42,2% (mortalidade confirmada 81,1%) no último dia de avaliação (15º dia) (Figura 19).



**Figura 19.** Primeira (A) e segunda (B) repetição de sobrevivência de lagartas *S. frugiperda* submetidas a tratamentos com *M. rileyi* em casa de vegetação: água destilada (T1), terra de diatomáceas (T2), aplicação prévia de MS + TD (T3), aplicação no dia zero (T4) e pulverização de conídios (T5). Na figura ao lado, médias diárias de temperatura e umidade da primeira (C) e segunda (D) repetição de cada experimento no tempo durante 14 dias.

Temperatura e umidade relativa (%) foram monitorados ao longo dos dias de experimento, desde a aplicação dos microescleródios 4 dias antes ao posicionamento das lagartas até a retirada das lagartas das plantas, totalizando 14 dias. Foi observada diferença nas condições de temperatura e umidade entre os experimentos, sendo que na segunda repetição a temperatura manteve uma média diária mais alta na maioria dos dias de avaliação (dias 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15) e, em relação à umidade e também apresentou taxas maiores de umidade relativa nos dias iniciais de experimento, o que é essencial para a germinação do fungo.

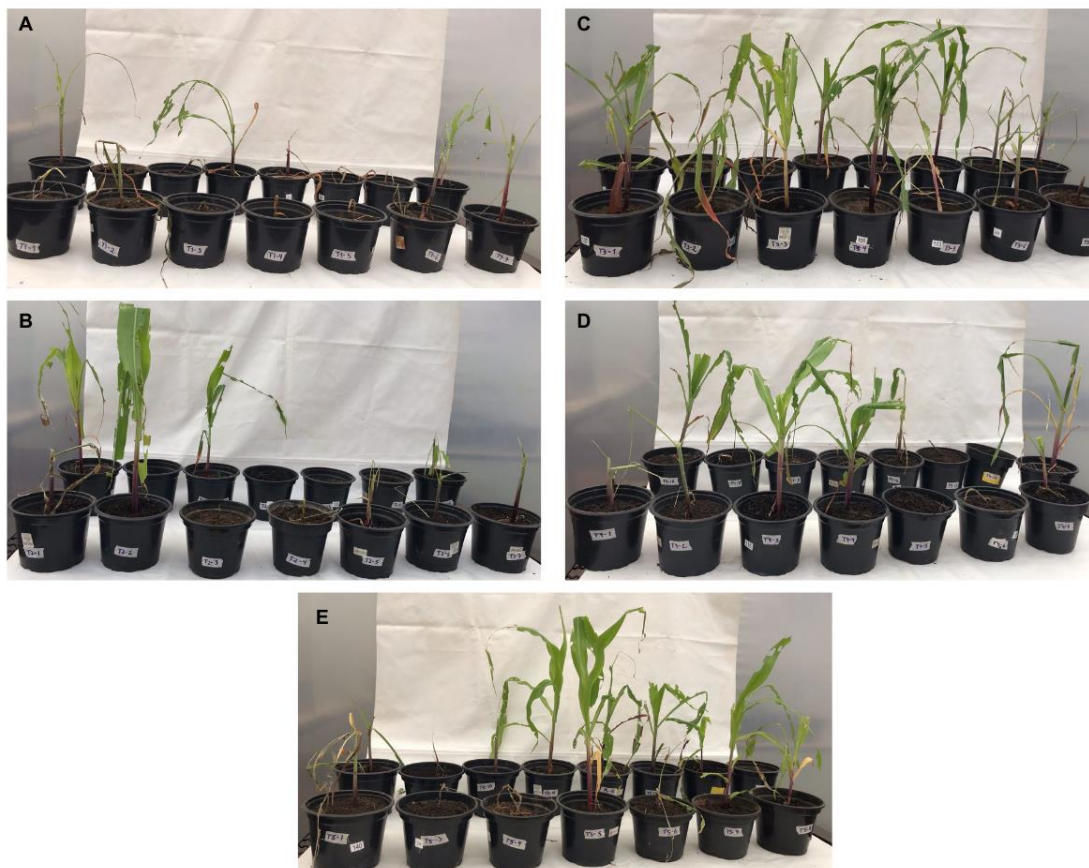
Quanto a biomassa úmida e seca, as diferentes repetições do experimento também apresentaram diferença entre si, sendo apresentadas de forma separada. No primeiro experimento, os tratamentos T3 e T5 apresentarem uma maior mortalidade (68,4% e 52,6% sobrevivência, respectivamente), e maior biomassa úmida das plantas em relação ao

tratamento T2 (terra de diatomáceas) ( $F = 6,6277$ ;  $df = 4$ ;  $p < 0,001$ ) (Tabela 7). O mesmo observado para biomassa seca. Já no segundo experimento, o tratamento T3 (microescleródios aplicados previamente) apesar de apresentar plantas maiores e menos danificadas visualmente (Figura 20), diferiu estatisticamente apenas dos controles em relação à biomassa seca e úmida (T3 peso úmido  $7,3 \pm 3,58$  g e peso seco  $1,1 \pm 0,68$  g) ( $F = 3,6$ ;  $df = 4$ ;  $p = 0,010$ ), enquanto os outros tratamentos com *M. rileyi* (microescleródios e pulverização de conídios) não apresentaram diferença estatística em relação aos controles (T1 e T2) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Valores de biomassa úmida e seca de plantas de milho em diferentes tratamentos com *M. rileyi*, após 10 dias de exposição a *S. frugiperda* em casa de vegetação.

Tratamento	Experimento 1		Experimento 2	
	Peso úmido (g)	Peso Seco (g)	Peso úmido (g)	Peso seco (g)
<b>T1</b>	$6,6 \pm 4,9$ <b>A</b>	$1,6 \pm 1,48$ <b>A</b>	$1,9 \pm 2,22$ <b>B</b>	$0,3 \pm 0,34$ <b>B</b>
<b>T2</b>	$1,9 \pm 2,7$ <b>B</b>	$0,5 \pm 0,76$ <b>B</b>	$3,6 \pm 4,76$ <b>B</b>	$0,5 \pm 0,68$ <b>B</b>
<b>T3</b>	$8,9 \pm 4,67$ <b>A</b>	$1,6 \pm 1,53$ <b>A</b>	$7,3 \pm 3,58$ <b>A</b>	$1,1 \pm 0,68$ <b>A</b>
<b>T4</b>	$8,2 \pm 5,46$ <b>A</b>	$0,6 \pm 0,38$ <b>AB</b>	$4,9 \pm 5,65$ <b>AB</b>	$0,8 \pm 1,06$ <b>AB</b>
<b>T5</b>	$11,2 \pm 5,91$ <b>A</b>	$1,2 \pm 0,82$ <b>A</b>	$4,7 \pm 4,6$ <b>AB</b>	$0,8 \pm 0,75$ <b>AB</b>

Média ( $\pm$  desvio padrão), letras diferentes na coluna indicam diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Tratamentos avaliados: água destilada (T1), terra de diatomáceas (T2), aplicação prévia de MS + TD (T3), aplicação no dia zero (T4) e pulverização de conídios (T5).



**Figura 20.** Plantas de milho utilizadas no segundo experimento em casa de vegetação: T1 - água destilada (A), T2 - terra de diatomáceas (B), T3 - aplicação prévia de MS + TD (C), T4 - aplicação no dia zero (D) e T5 - pulverização de conídios (E). após 10 dias de exposição a *S. frugiperda* em casa de vegetação.

#### 4.4 Discussão

É evidente na literatura o desempenho excepcional de *M. rileyi* para controle de lepidópteros, em especial a família Noctuidae. Outros fungos entomopatogênicos já foram relatados como virulentos para *S. frugiperda*, contudo na maioria das vezes exigem altas concentrações de inóculo para alcançar alta mortalidade (MONTECALVO; NAVASERO; 2021; IDREES et al., 2022; MAKOWICH et al., 2022). Os resultados de laboratório mostraram alta virulência do isolado ESALQ5611 tanto na forma de pulverização direta, pulverização indireta (contato da lagarta com a folha pulverizada) e com microescleródios previamente esporulados. A mortalidade de *S. frugiperda* foi muito mais rápida no tratamento de contato com microescleródios esporulados (3 – 4 dias) e isso se deve à grande concentração de conídios viáveis em uma pequena superfície (aproximadamente  $1 \times 10^7$  conídios em  $9 \text{ cm}^2$ ). Por outro lado, nos tratamentos de pulverização, durante esse processo acaba-se perdendo muito do inóculo pulverizado para a coluna interna ou parte inferior da torre de Potter (POTTER, 1952; LIU; STANSLY, 1995).

Apesar da rápida mortalidade causada pelos microescleródios, a confirmação da mortalidade foi baixa, como também foi observado por Gotti et al. (2023) utilizando o mesmo isolado de *M. riley*. Outro ponto observado no experimento em laboratório foi o fato da terra de diatomáceas sozinha ter causado uma taxa de mortalidade maior que o controle. Trabalhos já relataram a capacidade abrasiva deste inerte na cutícula e peças bucais de insetos, inclusive em *S. frugiperda*, debilitando assim a imunidade, causando desidratação e deixando estes mais suscetíveis a microrganismos do ambiente podendo gerar a morte (KORUNIC, 1998; CONSTANSKI et al., 2016; ANIWANOOU et al., 2021).

Em relação à mortalidade das lagartas colocadas sobre o solo, mais de 80% de lagartas em 5º instar morreram após exposição a 0,02 g de mistura de terra de diatomáceas e microescleródios aplicada no solo, sendo que aproximadamente 70% dos MS germinaram e esporularam. A partir disso, é evidente a alta virulência do isolado, tendo em vista que a quantidade de inóculo foi reduzida e a forma de infecção causada por meio do contato da lagarta andar sobre os microescleródios esporulados. Alguns trabalhos já apontaram o bom desempenho de microescleródios de *Metarhizium spp.* como uma alternativa para controle de pragas no solo. Jackson e Jaronski (2009) apontaram a eficiência de microescleródios de *M. anisopliae* no controle da larva de raiz *Tetanops myopaeformis* (Diptera: Ulidiidae) apresentando uma taxa de mortalidade de até 100% após 14 dias de tratamento do solo. Marciano et al. (2021) obtiveram desempenho significativo de formulações de microescleródios de *M. robertsii* no controle do carrapato-do-boi *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) e ainda observaram a permanência do fungo no solo durante 336 dias. Behle et al. (2013) obtiveram até 74% de mortalidade em *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) através do tratamento de substrato com formulação de microescleródios de *M. brunneum*.

O controle da lagarta é crucial em suas fases iniciais de desenvolvimento, contudo, é interessante controlar todos seus estágios de crescimento, uma vez que a morte do indivíduo encerra o ciclo de vida do inseto, reduzindo o dano e prevenindo futuras gerações. A lagarta em seus estágios finais de desenvolvimento alimenta-se de forma mais voraz, causando mais danos (CRUZ, 1995; DEOLE; PAUL, 2018), e também apresenta maior tolerância a infecção, demandando uma quantidade maior de inóculo. Apesar disso, o isolado ESALQ 5611 apresentou alta virulência a lagartas de *S. frugiperda* até mesmo em instares avançados de desenvolvimento (5º instar). Ademais, a produção de conídios pelos microescleródios no solo foi relativamente rápida, sendo necessários apenas 4 dias de incubação para produzir uma quantidade letal de inóculo para lagartas de 5º instar. Conforme destacado por Ignoffo et al. (1976), uma única lagarta de último instar de *Hypena scabra* (Lepidoptera: Erebidiae)



(Fabricius) esporulada seria suficiente para gerar o inóculo inicial aplicado em cinco fileiras de um campo de soja contendo 5,7 a 6,7 plantas por fileira. Pensando nisso, a mortalidade de lagartas de último ínstar de *S. frugiperda* seria essencial para geração de inóculo e permanência do isolado no campo, colaborando, provavelmente, para ciclos de epizootias do fungo na população desse inseto-alvo.

Nos ensaios de casa de vegetação, as maiores taxas de mortalidade foram obtidas pelo tratamento com pulverização de conídios, e ainda assim, foram taxas baixas quando comparadas aos testes de laboratório, sendo que outros trabalhos, como o de Faria et al. (2021), obteve-se altas taxas de mortalidade tanto em laboratório quanto em casa de vegetação. Foi observado também que a terra de diatomáceas sozinha apresentou um índice de mortalidade, corroborando com os dados obtidos em laboratório, e reforçando a possibilidade de sua capacidade abrasiva na cutícula e peças bucais do inseto. Provavelmente, o fungo teve seu desempenho significativamente afetado pelas condições ambientais na casa de vegetação. Isso deve-se ao fato de que os microescleródios necessitam de umidade superior a 90% para germinação e por determinado tempo, conforme apontado em experimentos no primeiro capítulo deste estudo e em outros trabalhos da literatura (RODRIGUES et al., 2021). Testes previamente realizados em campo mostraram valores de umidade relativa média dentro do cartucho do milho antes de períodos de chuva de 72,2% e, após períodos de chuva de 91,9% (FETTER, 2022 dados não publicados). Baseando-se nestes valores espera-se que resultados em campo poderiam ser mais promissores que no ambiente controlado da casa de vegetação, onde não ocorreu a precipitação. Outra característica desfavorável que merece ser mencionada em relação à casa de vegetação é a evapotranspiração, um aspecto abordado em inúmeros trabalhos como sendo consideravelmente reduzido dentro do ambiente controlado em comparação ao campo (ROSENBERG et al., 1989; FERNANDES et al., 2003). Apesar da casa de vegetação normalmente ser um ambiente mais controlado em relação ao campo, pode ser ocasionalmente menos propício para a germinação e desenvolvimento de microescleródios por não atingir o ponto de orvalho, já que essas estruturas dependem intensamente de condições de alta umidade.

Para a avaliação da utilização de MS no campo, pensando no seu tamanho grande em relação a outras estruturas dos fungos e sua forma indireta de ação, a estratégia inundativa não pode ser considerada como é feito com conídios aéreos. Autores apontam que na estratégia inoculativa de controle biológico, mesmo com baixa mortalidade, o inóculo pode permanecer no campo gerando novas epizootias e se estabelecendo na população da praga local (HESKETH et al., 2010; BOOMSMA et al., 2014). Além disso, os autores apontam que o

controle biológico inundativo, comumente utilizado na agricultura, pode ser ocasionalmente substituído pelo inoculativo, dependendo da característica de cada fungo.

O controle biológico inoculativo parte da premissa da liberação de uma pequena quantidade do agente de controle biológico, com objetivo que ele se multiplique e estabeleça sua população na plantação por um determinado período controlando a praga-alvo, mas que com o passar do tempo necessita uma nova aplicação. É visto como um controle a longo prazo, e que pode ser utilizado de forma preventiva a partir do monitoramento das culturas (IGNOFFO et al., 1976; EILENBERG et al., 2001; PARRA et al., 2002). *M. rileyi* possui muitas características que o enquadrariam como um grande candidato no controle biológico inoculativo no Brasil para lagartas: apresenta alta capacidade epizoótica (ALVES, 1998; COSTA et al., 2015; FRONZA et al., 2017; FARIA et al., 2021), o clima tropical propicia um ambiente favorável a epizootias (FRONZA et al., 2017), persistência no solo durante grandes intervalos de tempo (SPRENKEL; BROOKS, 1977; IGNOFFO et al., 1978; THORVILSON et al., 1985; DEVI, 1995). Além disso, a aplicação inoculativa seria mais viável do que a inundativa no caso de microescleródios, pois demanda concentrações menores de inóculo aplicado. Por outro lado, estudos sobre a utilização de *M. rileyi* no campo são poucos, e ainda assim, grande parte destes trabalhos já apontaram que mesmo a aplicação de altas concentrações de conídios aéreos de *M. rileyi* sobre o milho não obtiveram altas taxas de mortalidade de *S. frugiperda*, principalmente devido a seu hábito alimentar dentro do cartucho, o que mantém a lagarta protegida (IGNOFFO; GARCIA, 1985; BARROS et al., 2021; FARIA et al., 2021).

Por fim, foi evidente que o desempenho em laboratório apresentado no primeiro capítulo foi muito bom provavelmente pela manutenção de alta umidade, que se mostrou um fator limitante na germinação e desempenho deste propágulo. O mercado de biológicos está em crescimento constante, e o estudo de novas metodologias de aplicação e novas formas de utilizar os microrganismos precisam ser explorados, e o microescleródio é um deles (principalmente para um fungo tão desafiador, como *M. rileyi*). Entretanto, mais pesquisas seriam necessárias especialmente através de experimentos em campo, e também seria de grande interesse o estudo de *M. rileyi* como um microrganismo endofítico para o milho: seu efeito no crescimento da planta e indução do sistema de defesa das plantas.

## Referências

- ALLEN, G. E.; GREENE, G. L.; WHITCOMB, W. H. An epizootic of *Spicaria rileyi* on the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in Florida. **The Florida Entomologist**, v. 54, n. 2, p. 189–191, 1971.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, p. 21 - 37, 1998.
- ANIWANOU, C. T. S.; SINZOGAN, A. A. C.; DEGUENON, J. M.; SIKIROU, R.; STEWART, D. A.; AHANCHEDE, A. Bio-efficacy of diatomaceous earth, household soaps and Neem Oil against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Benin. **Insects**, v. 12, n. 1, 2021. Doi: <https://doi.org/10.3390/insects12010018>
- BARROS, S. K. A.; ALMEIDA, E. G.; FERREIRA, F. T. R.; BARRETO, M. R.; LOPES, R. B.; PITTA, R. M. Field efficacy of *Metarhizium rileyi* applications against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. **Neotropical Entomology**, v. 50, n. 6, p. 976 – 988, 2021. Doi: 10.1007/s13744-021-00903-0
- BEHLE, R. W.; JACKSON, M. A.; FLOR-WEILER, L. B. Efficacy of a granular formulation containing *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) microsclerotia against nymphs of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixoididae). **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 1, p. 57 – 63, 2013. Doi:10.1603/EC12226 \*\*\*
- BOOMSMA, J. J.; JENSEN, A. B.; MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Evolutionary interaction networks if insect pathogenic fungi. **Annual Review of Entomology**, v. 59, n. 1, p. 467 – 485, 2014. Doi: 10.1146/annurev-ento-011613-162054
- BURTET, L. M.; BERNARDI, O.; MELO, A. A.; PES, M. P.; STRAHL, T. T.; GUEDES, J. V.C. Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in south Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n. 12, p. 2569-2577, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.4660>
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) – **Acompanhamento da safra brasileira 2022/23**. Disponível em: [file:///C:/Users/isabe/Downloads/E-book\\_BoletimZdeZSafrasZ-Z4oZlevantamento.pdf](file:///C:/Users/isabe/Downloads/E-book_BoletimZdeZSafrasZ-Z4oZlevantamento.pdf) Acesso em: 05 de Junho de 2023.
- CONSTANSKI, K. C.; ZORZETTI, J.; SANTORO, P. H.; HOSHINO, A. T.; NEVES, P. M. O. J. Inert powders alone or in combination with neem oil for controlling *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 1801 – 1810, 2016. Doi: 10.5433/1679-0359.2016v37n4p1801
- COSTA, V. H. D.; SOARES, M. A.; RODRÍGUEZ, F. A. D.; ZANUNCIO, J. C.; SILVA, I. M.; VALICENTE, F. H. *Nomuraea rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 98, n. 2, p. 796–798, 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.1653/024.098.0263>
- CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 45p., 1995.
- DEOLE, S.; PAUL, N. First report of fall army worm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), their nature of damage and biology on maize crop at Raipur, Chhattisgarh. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 6, n. 6, p. 219 – 221, 2018.
- DEVI, P. S. V. Soil treatment with *Nomuraea rileyi*: A promising technique for the control of *Spodoptera litura* on groundnut. **Biocontrol, Science and Technology**, v. 5, n. 3, 1995. <https://doi.org/10.1080/09583159550039800>

- DIEZ-RODRÍGUES, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 311 – 316, 2001. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2001000200016>
- EDELSTEIN, J. D.; LECUONA, R. E.; TRUMPER, E. V. Selection of culture media and in vitro assessment of temperature-dependent development of *Nomuraea rileyi*. **Biological Control**, v. 33, n. 6, p. 737 – 742, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2004000600011>
- EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **BioControl**, v. 46, p. 387 – 400, 2001.
- ESTEFAN, G.; SOMMER, R.; RYAN, J. **Methods of Soil, Plant, and Water Analysis: A manual for the West Asia and North Africa region**. 3<sup>a</sup> ed. Beirut: International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), 2013.
- FARIA, M.; SOUZA, D. A.; SANCHES, M. M.; SCHMIDT, F. G. V.; OLIVEIRA, C. M.; BENITO, N. P.; LOPES, R. B. Evaluation of key parameters for developing a *Metarhizium rileyi*-based biopesticide against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize: laboratory, greenhouse, and field trials. **Pest Management Science**, v. 78, n. 3, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.6729>
- FARIAS, J. R.; ANDOW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; SORGATTO, R. J.; FRESIA, P.; SANTOS, A. C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance do Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p. 150 – 158, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.019>
- FATORETTO, J. C.; MICHEL, A. P.; FILHO, M. C. S.; SILVA, N. Adaptive potential of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) limits Bt trait durability in Brazil. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 8, n. 1, p. 1 – 10, 2017. Doi: 10.1093/jipm/pmx011
- FERNANDES, C.; CORÁ, J. E.; ARAÚJO, J. A. C. Reference evapotranspiration estimation inside greenhouses. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 3, p. 591 – 594, 2003. Doi: 10.1590/S0103-90162003000300027
- FRONZA, E.; SPECHT, A.; HEINZEN, H.; BARROS, N. M. *Metarhizium (Nomuraea) rileyi* as biological control agent. **Biocontrol, Science and Technology**, v. 27, n. 11, p. 1243 – 1264, 2017. Doi: 10.1080/09583157.2017.1391175
- GARLET, C. G.; GUBIANI, P. S.; PALHARINI, R. B.; MOREIRA, R. P. GODOY, D. N.; FARIAS, J. R.; BERNARNI, O. Field-evolved resistance to chlorpyrifos by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Inheritance mode, cross-resistance patterns, and synergism. **Pest Management Science**, v. 77, p. 5367 – 5374, 2021. Doi: 10.1002/ps.6576
- GOTTI, I. A.; MOREIRA, C. C.; DELALIBERA Jr., I.; LICHT, H. H. D. Blastospores from *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium rileyi* are not always as virulent as conidia are towards *Spodoptera frugiperda* caterpillars and use different infection mechanisms. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1594, 2023. Doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061594>
- GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, p. 487 – 488, 1976.
- GRÜTZMACHER, A. D.; MARTINS, J. F. S.; CUNHA, U. S. Insetos pragas das culturas do milho e sorgo no agroecossistema de várzea. In: PARFITT, J. M. B. **Produção de milho e sorgo na várzea**. Pelotas: Embrapa de Clima Temperado, 2000. p. 87-101. (Embrapa de Clima Temperado. Documentos, 74).

- HESKETH, H.; ROY, H. E.; EILENBERG, J.; PELL, J. K.; HAILS, R. S. Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. **Biocontrol**, v. 55, p. 55 – 73, 2010.
- IGNOFFO, C. M.; MARSTON, N. L.; HOSTETTER, D. L.; PUTTLER, B.; BELL, J. V. Natural and induced epizootics of *Nomuraea rileyi* in soybean caterpillars. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 27, n. 2, p. 191 – 198, 1976. Doi:10.1016/0022-2011(76)90145-2
- IGNOFFO, C. M.; GARCIA, C.; HOSTETTER, D. L.; PINNELL, R. E. Stability of conidia of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, in and on soil. **Environmental Entomology**, v. 7, n. 5, p. 724 – 727, 1978. Doi: <https://doi.org/10.1093/ee/7.5.724>
- IGNOFFO, C. M.; GARCIA, C. Host spectrum and relative virulence of an Ecuadoran and a Mississippian biotype of *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 45, p. 346 – 352, 1985. Doi: [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(85\)90113-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(85)90113-2)
- IDREES, A.; AFZAL, A.; QADIR, Z. A.; LI, J. Bioassays of *Beauveria bassiana* isolates against the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 7, p. 717, 2022. Doi:<https://doi.org/10.3390/jof8070717>
- JACKSON, M. A.; JARONSKI, S. T. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. **Mycological research**, v. 113, n. 8, p. 842 – 850, 2009.
- KORUNIC, Z. Diatomaceous earth: a group of natural insecticides. **Journal of Stored Product Research**, v. 34, n. 2, p. 87-97, 1998.
- LIU, T.; STANSLY, P. A. Deposition and bioassay of insecticides applied by leaf dip and spray tower against *Bemisia argentifolii* nymphs (Homoptera: Aleyrodidae). **Pesticide Science**, v. 44, p. 317 – 322, 1995. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.2780440403>
- MAKOWICH, A. F. F.; ALENCAR, A. G. G.; SOUSA, L. M.; BOAVENTURA, H. A.; GODINHO, K. C. A.; QUINTELA, E. D. Virulência de *Cordyceps javanica* a *Helicoverpa armigera* (Hübner) e *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em dieta natural e artificial. In: Anais XXVII Congresso Brasileiro de Entomologia, 2022, Fortaleza.
- MARCIANO, A.F.; MASCARIN, G.M.; FRANCO, R.F.F.; GOLO, P. S.; JARONSKI, S. T.; FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Innovative granular formulation of *Metarhizium robertsii* microsclerotia and blastospores for cattle tick control. **Scientific Reports**, v. 11, n. 4972, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84142->
- MONTECALVO, M. P.; NAVASERO, M. M. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. And *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin to *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences**, v. 27, n. 1, p. 15 – 26, 2021. Doi:
- MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D. R. A Case Study in Biological Control: Soybean Defoliating Caterpillars in Brazil. **International Crop Science**, p. 115 – 119, 1993. <https://doi.org/10.2135/1993.internationalcropscience.c20>
- NASCIMENTO, A. R. B.; FARIAS, J. R. F.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R. J.; OMOTO, C. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. **Pest Management Science**, v. 72, n. 4, p. 810 – 815, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.4057>

- PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. Controle biológico: terminologia. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores**. São Paulo: Manole, 635 p., 2002.
- POTTER, C. An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on the electrostatic charge on atomized spray fluids. **Annals of Applied Biology**, v. 39, n. 1, 1952. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1952.tb00993.x>
- RODRIGUES, J.; CATÃO, A. M. L.; DOS SANTOS, A. S.; PAIXÃO, F. R. S.; SANTOS, T. R.; MARTINEZ, J. M.; MARRETO, R. N.; MASCARIN, G. M.; FERNANDES, E. K. K.; HUMBER, R. A.; LUZ, C. Relative humidity impacts development and activity against *Aedes aegypti* adults by granular formulations of *Metarhizium humberi* microsclerotia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 7, p. 2725-2736, 2021. Doi: 10.1007/s00253-021-11157-6.
- ROSENBERG, N.J.; MCKENNEY, M.S.; MARTIN, P. Evapotranspiration in a greenhouse-warmed world: A review and a simulation. **Agricultural and Forest Meteorology** v. 47, p.303-320, 1989.
- SPRENKEL, R. K.; BROOKS, W. M. Winter survival of the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* in North Carolina. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 29, n. 3, p. 262 – 266, 1977. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(77\)80031-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(77)80031-1)
- SONG, Z.; YIN, Y.; JIANG, S.; LIU, J.; CHEN, H.; WANG, Z. Comparative transcriptome analysis of microsclerotia development in *Nomuraea rileyi*. **BMC genomics**, v. 14, n. 411, p. 1- 9, 2013.
- THAKRE, M.; THAKUR, M.; MALIK, N.; GANGER, S. Mass scale cultivation of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* using agricultural products and agro wastes. **Journal of Biopesticides**, v. 4, n. 4, p. 176 – 179, 2011.
- THORVILSON, H. G.; LEWIS, L. C.; PEDIGO, L. P. Overwintering Potential of *Nomuraea rileyi* (Fungi: Deuteromycotina) from *Plathypena scabra* (Lepidoptera: Noctuidae) Cadavers in Central Iowa. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 58, n. 4, p. 662-667, 1985.
- VALICENTE, F. H. **Manejo integrado de pragas na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2015.
- ZHONG, J.; FRASES, S.; WANG, H.; CASADEVALL, A.; STARK, R. E. Following fungal melanin biosynthesis with solid-state NMR: biopolymer molecular structures and possible connections to cell-wall polysaccharides. **Biochemistry**, v. 47, n. 16, p. 4701 – 4710, 2008.