

Efeito de cepas de *Bacillus* sp. sobre a mortalidade de *Spodoptera frugiperda* em condições de laboratório

Effect of strains of Bacillus sp. on the mortality of Spodoptera frugiperda under laboratory conditions

THAIGORU SOARES DE SOUSA

Discente do curso de Agronomia - UNIPAM

E-mail: thaigoruss@unipam.edu.br

WALTER VIEIRA DA CUNHA

Professor orientador - UNIPAM

E-mail: walter@unipam.edu.br

Resumo: O trabalho objetivou avaliar, em laboratório, o efeito de diferentes cepas de *Bacillus* sobre a mortalidade de *S. frugiperda*. O experimento foi realizado no laboratório de Genética e Biotecnologia do UNIPAM, em Patos de Minas, utilizando lagartas e bactérias do acervo do laboratório. Os tratamentos foram os seguintes: testemunha, produto comercial e dez cepas aleatórias; com dez repetições, em delineamento inteiramente casualizado. Inicialmente fizeram-se meio de cultura para desenvolvimento das bactérias e dieta para as lagartas. Posteriormente montou-se o bioensaio de patogenicidade, sendo a mortalidade verificada após sete dias. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey (0,05% de significância). A testemunha, a cepa 1 e a cepa 8 não causaram a morte de lagartas, enquanto os demais tratamentos apresentaram diferentes níveis de mortalidade (entre 84 e 12%). Concluiu-se que algumas cepas de bactérias do gênero *Bacillus* podem promover a mortalidade de *S. frugiperda*.

Palavras-chave: Patogenicidade. Controle biológico. Lagarta do cartucho.

Abstract: This work aimed to evaluate, in a laboratory, the effect of different *Bacillus* on the mortality of *S. frugiperda*. The experiment was conducted in the laboratory of Genetics and Biotechnology of UNIPAM in Patos de Minas, using caterpillars and bacteria from the laboratory collection. The treatments were as follows: control, commercial product, and ten random strains, with ten repetitions, in an entirely randomized design. Initially, a culture medium for bacterial development and a diet for the caterpillars were prepared. Then, the pathogenicity bioassay was performed and mortality was checked after seven days. Data were subjected to analysis of variance and means were compared using Tukey's test (0.05% significance). The control, strain 1, and strain 8 did not result in caterpillar death, while the other treatments had varying levels of mortality (ranging from 84 to 12%) for *S. frugiperda*.

Keywords: Pathogenicity. Biological control. Fall armyworm.

1 INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, é uma espécie que se destaca na agricultura brasileira, principalmente na cultura do milho, estendendo seus danos por todos os estádios de desenvolvimento da planta. Após a formação do cartucho, a lagarta se aloja em seu interior, dificultando as medidas de controle, principalmente o químico, mais utilizado pelos agricultores (BARCELOS; ANGELINI, 2018). Apesar de eficiente e bastante utilizado, o controle químico pode gerar problemas como maior risco de contaminação ambiental, aumento nos custos de produção, além de ser, na maioria das vezes, incompatível com outros métodos de controle (MENDES *et al.*, 2011).

Dessa forma, a utilização do Manejo Integrado de Pragas (MIP) com ênfase na tática do controle biológico tem adquirido importância nas últimas décadas, pois promove uma maior sustentabilidade e viabilidade ecológica no agrossistema (GOMES *et al.*, 2018). O controle biológico é definido como uma ação de inimigos naturais sobre uma população de pragas, resultando na diminuição da população (POLANCZYK, 2004). Dentro do segmento do controle biológico, surgiram os microrganismos entomopatogênicos, especialmente fungos, vírus e bactérias (FATORETTO *et al.*, 2007).

Um dos mais difundidos inseticidas biológicos, de natureza microbiana, é o gênero *Bacillus*. Essas bactérias gram-positivas, isoladas do solo, têm capacidade de produzir endotoxinas que afetam severamente o sistema digestivo das lagartas, levando-as à morte (HORTA *et al.*, 2017). Além disso, apesar de os produtos comerciais disponíveis serem limitados ao controle de lepidópteros, dípteros e coleópteros, estudos mostram que mais de 1000 espécies de insetos, pertencentes a várias ordens, são sensíveis a bactérias desse gênero (POLANCZYK, 2004). Outro fator importante é que essas bactérias não possuem efeito poluente, são inócuas aos mamíferos, a outros invertebrados e plantas (BERNARDES; THULER; THULER, 2018).

Como técnicas de controle de pragas pelo uso de *Bacillus*, podemos citar os bioensaios de patogenicidade, que são estudos realizados em laboratório, com a finalidade de selecionar cepas mais eficazes no controle dos insetos. A eficácia pode ser avaliada através dos testes de patogenicidade realizados contra algumas lagartas, entre elas, a *S. frugiperda* (BECHELENI *et al.*, 2017).

Assim, objetivou-se avaliar, em condições de laboratório, o efeito de diferentes cepas de *Bacillus* sobre a mortalidade de lagartas de *S. frugiperda*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido no Laboratório de Genética e Biotecnologia (GENEB) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

2.1 ORIGEM DOS INSETOS PRAGA (SPODOPTERA FRUGIPERDA)

Utilizaram-se insetos (*Spodoptera frugiperda*) em fase larval, originados da criação já estabelecida no Laboratório de Genética e Biotecnologia (GENEB) do Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM.

2.2 SELEÇÃO E ORIGEM DAS CEPAS BACTERIANAS (*Bacillus* sp.)

Foram selecionadas ao acaso dez cepas de *Bacillus* sp. do acervo do Laboratório de Genética e Biotecnologia (GENEB) do Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM.

Estas foram obtidas por meio de coletas feitas no município de Patos de Minas, em diversos substratos, de acordo com a metodologia descrita no protocolo do laboratório.

2.3 PREPARO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Inicialmente foi preparado o meio de cultura Luria Bertani (LB) acrescido de sais (líquido), para crescimento da bactéria, apresentando a seguinte composição: glicose (1g), caldo nutritivo (8g), extrato de levedura (5g), triptona (10g), NaCl (5g), MgSO₄(0,3g), FeSO₄(0,02g), ZnSO₄(0,02g) e MnSO₄(0,02g). Cada um dos reagentes foi pesado separadamente e colocado em um Becker contendo aproximadamente 800 mL de água destilada. Os reagentes foram diluídos com auxílio de agitador magnético e, em seguida, utilizou-se pHmetro para acertar o pH do meio a 7,5, sendo a correção feita com solução base (NaOH 3M). Por fim, o volume foi aferido até 1000 mL.

Desse meio, foram distribuídos 40 mL em 24 erlenmeyers. Posteriormente, cada erlenmeyer foi vedado com algodão e envolto em tecido e papel alumínio, sendo autoclavado durante 15/20 minutos. Durante esse período, a capela de fluxo laminar foi limpa e permaneceu ligada sob luz UV. Após a autoclavagem, os erlenmeyers contendo o meio de cultura foram levados à capela, onde se realizou a inoculação utilizando-se 100µL de cada cepa da bactéria (BECHELENI *et al.*, 2017).

2.4 PREPARO DA DIETA DOS INSETOS

Foi preparada a dieta artificial para a realização dos testes de bioensaios para a *Spodoptera frugiperda*, apresentando a seguinte composição: feijão carioca (111,0g), ágar puro (13,6g), gérmen de trigo (52,8g), levedura de cerveja (33,8g), ácido ascórbico 99% (3,4g), ácido sórbico 99% (1,1g), nipagin-metil-parahidroxibenzonato (2,1g), formaldeído 36% (2,76 mL), solução inibidora - ácido propiônico 41,8%, ácido fosfórico 4,2% e água 54% (2,76mL), sendo colocados em recipientes separados.

O feijão foi colocado em imersão com 1 litro de água, durante 12 horas, sendo autoclavado por 30 minutos, em temperatura mínima, e 10 minutos, em temperatura média, após atingir 120°C (1 atm de pressão). O ágar foi colocado em um erlenmeyer, adicionando-se água destilada até o volume de 433 mL, sendo levado ao microondas por 10 minutos e retirado em intervalos de 1 minuto para se agitar a solução, com o auxílio de uma colher, até levantar fervura. Após esse processo, foi desligado e mantido em estufa a +/-70°C até o momento do preparo da dieta.

No liquidificador, trituraram-se o germe de trigo, a levedura de cerveja, o ácido ascórbico e o nipagin, com 466 mL de água destilada, durante 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado a essa mistura o ágar e, depois, o feijão quente, triturando-se por mais 5 minutos.

A dieta então foi vertida em uma forma quadrada, sendo mantida sob luz UV por 20 minutos, de acordo com a metodologia descrita por Becheleni *et al.* (2017).

2.5 BIOENSAIO DE PATOGENICIDADE

O bioensaio de patogenicidade foi feito de acordo com a metodologia descrita por Becheleni *et al.* (2017). Utilizaram-se suportes de isopor para colocar os potes plásticos de 50 mL, identificados pelos registros das bactérias. Para cada tipo de isolado bacteriano, foram feitas 10 repetições, adicionando-se 1cm³ da dieta artificial. Utilizou-se uma alíquota de 165 µL em cada tratamento, sendo uma testemunha, um produto comercial e dez cepas bacterianas diferentes, totalizando-se 12 tratamentos. Como Testemunha (T₁), utilizou-se água destilada autoclavada isenta do patógeno. Além disso, utilizou-se nas mesmas proporções um produto comercial à base de *Bacillus* sp. (Dipel WG[®]), com uso bastante difundido entre os produtores. Esse produto é indicado para algumas lagartas, porém ainda não há recomendações para a *S. frugiperda* (T₂). Já as cepas bacterianas foram escolhidas ao acaso, no acervo do laboratório.

Após a secagem da cultura bacteriana adicionada à dieta, uma lagarta de segundo ínstar de *S. frugiperda* foi colocada em cada copo, devidamente fechado com tampa de acrílico. Foram testadas 10 lagartas por repetição, com um total de 110 lagartas testadas, mediante protocolo do Laboratório de Genética e Biotecnologia (GENEB).

Os bioensaios foram acondicionados na sala de experimentos climatizada sob as mesmas condições da sala de criação dos insetos (26 +/-2°C e fotoperíodo de 12 horas). Após sete dias da montagem, realizaram-se as avaliações para constatação da mortalidade das lagartas. Verificou-se a eficiência de controle de cada um dos isolados bacterianos, com as médias e as porcentagens da mortalidade dos insetos calculadas em cada um dos tratamentos.

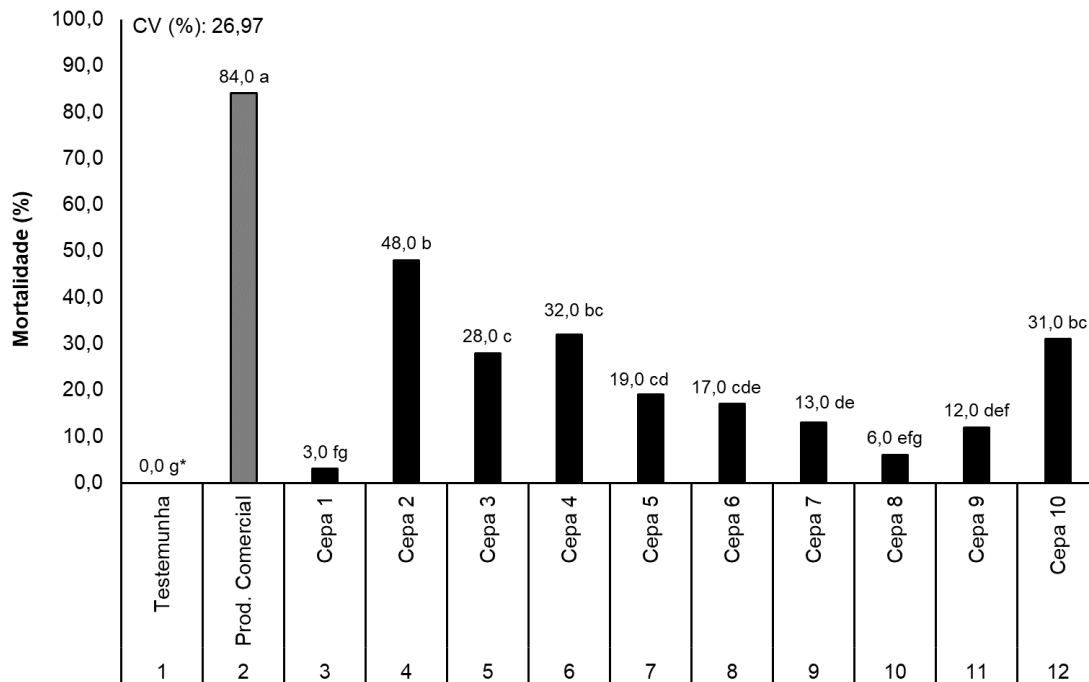
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram obtidos em porcentagem. Posteriormente foram transformados para realização dos testes estatísticos ($\arcsen * (\text{raiz de } x / 100)$). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

A mortalidade das lagartas, verificada aos sete dias após a montagem do experimento, pode ser observada na Figura 1. A testemunha com água, a cepa 1 e a cepa 8 foram estatisticamente semelhantes, com média de 3% de mortalidade. Além disso, destacou-se o uso do produto comercial, com mortalidade de 84%. Entre as cepas oriundas do laboratório, as cepas 2, 4 e 10 apresentaram mortalidade acima de 30%; as demais foram entre 12 e 28%.

Figura 1: Mortalidade (%) de *S. frugiperda* no trabalho “Efeito de cepas de *Bacillus* sp. sobre a mortalidade de *Spodoptera frugiperda* em condições de laboratório”, Patos de Minas, MG. 2021



* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Fonte: dados da pesquisa, 2021.

Esse resultado pode estar relacionado à presença ou não de proteínas específicas codificadas pelos genes *cry1Aa*, *cry1Ab* e *cry1Ac*, que são altamente tóxicos aos insetos da ordem dos lepidópteros. Para confirmar essa teoria, devem ser realizadas pesquisas futuras envolvendo a caracterização molecular das cepas testadas, determinando as proteínas envolvidas na atividade tóxica das cepas testadas (FATORETTO *et al.*; 2007; SILVEIRA *et al.*, 2011; BECHELENI *et al.*; 2017).

Outro fator a ser considerado, segundo Fatoretto *et al* (2007), é a quantidade de esporos viáveis em cada isolado, pois essa quantidade determina o nível de controle das lagartas. Isso pode explicar por que o produto comercial testado apresentou alto índice de controle, pois, segundo a bula, ele possui alto nível de esporos viáveis (mínimo de 27,5 bilhões por grama). Além disso, há os genes supracitados.

Ademais, é importante ressaltar que a manipulação das cepas no laboratório passa por diversas etapas, e qualquer alteração no seu manuseio pode alterar sua toxicidade: temperatura e umidade de cultivo, pH e quantidade de oxigênio dissolvido no meio de cultura (VALICENTE *et al.*, 2015).

Resultados semelhantes foram obtidos por Silveira *et al.* (2011), testando bactérias do gênero *Bacillus* no controle de Ácaro rajado (*Tetranychus urticae*). Becheleni *et al.* (2017) e Constanski *et al.* (2015) também encontraram diferentes níveis de mortalidade com diferentes cepas de *Bacillus*.

4 CONCLUSÃO

Concluiu-se que bactérias do gênero *Bacillus* podem promover a mortalidade de lagartas *S. frugiperda*. Apesar disso, ainda devem ser realizados mais estudos para seleção e caracterização de cepas mais eficientes, não só nessa espécie de lagartas, mas também em outras.

REFERÊNCIAS

- BARCELOS, P. H. S.; ANGELINI, M. R. Controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) em diferentes tecnologias Bts (*Bacillus thuringiensis*) na cultura do milho. **Journal of Neotropical Agriculture**, Cassilândia, v. 5, n. 1, p. 35-40, 27 mar. 2018.
- BECHELENI, F. R. C. *et al.* Aplicação Biotecnológica da bactéria *Bacillus thuringiensis* no controle biológico da lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda*. **Revista Brasileira de Ciências da Vida**, Sete Lagoas, v. 5, n. 1, p. 1-17, jul. 2017.
- BERNARDES, J. V. A.; THULER, A. M. G.; THULER, R. T. Seleção de *Bacillus thuringiensis* isolados na região do triângulo mineiro para controle de *Spodoptera frugiperda*. SEMINÁRIO DE PESQUISA E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, 2., 2018, Uberaba. **Anais [...]** Uberaba: Sepit, v. 2, p. 1-5, 2018.
- CONSTANSKI, K. C. *et al.* Seleção e caracterização molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Spodoptera* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 8, p. 730-733, ago. 2015.
- FATORETTO, J. C. *et al.* Associação de bioensaios e caracterização molecular para seleção de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 5, p. 737-745, out. 2007.
- GOMES, J. M. *et al.* Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) por bactérias. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 13, n. 2, p. 156, 1 abr. 2018.
- HORTA, A. B. *et al.* Toxinas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Aplicada à Agro & Indústria**, São Paulo, v. 4, n. 1, p. 737-774, 31 jan. 2017.
- MENDES, S. M. *et al.* Respostas da lagarta-do-cartucho a milho geneticamente modificado expressando a toxina Cry 1A(b). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 3, p. 239-244, mar. 2011.
- POLANCZYK, R. A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**. 2004. 144 f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.

EFEITO DE CEPAS DE *BACILLUS* SP. SOBRE A MORTALIDADE DE
SPODOPTERA FRUGIPERDA EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

SILVEIRA, L. F. V. *et al.* Seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner para *Tetranychus urticae* Koch. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 2, p. 273-278, 2011.

VALICENTE, F. H. **Manejo Integrado de Pragas na Cultura do Milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2015. (Circular Técnica 208).