

# Avaliação de toxicidade de cepas de *Bacillus* sp no controle da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda* - Lepdoptera:Noctuidae)

*Bacillus* sp strains toxicity evaluation in controlling fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* - Lepdoptera:Noctuidae)

**Thays Stella Barcelos Dias**

Graduanda do curso de Agronomia (UNIPAM).

E-mail: thaysstella@hotmail.com

**Ariele Cristina Moreira Santos**

Graduanda do curso de Agronomia (UNIPAM).

E-mail: arielecristina17@hotmail.com

**Walter Vieira da Cunha**

Professor orientador (UNIPAM).

E-mail: walter@unipam.edu.br

---

**Resumo:** Uma das principais pragas da cultura do milho é a Lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidade). Seus danos podem causar perdas de até 34% nessa cultura. O seu controle é baseado, principalmente, em produtos químicos, e, recentemente, vêm sendo desenvolvidas novas alternativas a base de produtos de controle biológico que são mais específicos e causam menos impactos ao ambiente. O gênero *Bacillus* sp tem sido largamente utilizado no controle de diversas pragas, e produtos comerciais com base nessa bactéria têm tido sucesso contra a lagarta do cartucho. Este estudo avaliou a mortalidade de 22 cepas de *Bacillus* sp contra *Spodoptera frugiperda*. Os isolados testados apresentaram percentual de mortalidade larval em *S. frugiperda* de 0,00 a 66,67%. As cepas 70,72, 88 e 90 apresentaram mortalidade acima de 75,00% até a fase de pupa.

**Palavras-chave:** Lagarta do cartucho. Controle biológico. Bactérias. Zea mays.

**Abstract:** One of the main pests of corn is the army worm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidade). Their damage can cause losses of up to 34% in this culture. Its control is based mainly in chemicals and new alternatives have recently being developed based on biological control products that are more specific and cause less impact to the environment. The genus *Bacillus* sp has been widely used for controlling various pests, and commercial products based on this bacterium have been successful against cartridge Caterpillar. This study evaluated the mortality of 22 strains of *Bacillus* sp against *Spodoptera frugiperda*. The isolates tested showed larval mortality percentage in *S. frugiperda* from 0.00 to 66.67%. Strains 70,72, 88 and 90 had a mortality rate up to 75.00% pupation.

**Keywords:** Fall armyworm. Biological control. Bacteria. Zea mays.

---

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil, hoje, vive um momento crescente no setor agropecuário, batendo recordes seguidos de produção de grãos nas últimas safras, caminhando, segundo previsões, para tornar-se, em breve, o maior produtor mundial. Segundo a CONAB (2013), na safra 2012/2013, a produção brasileira de grãos foi de 184,1 milhões de toneladas, um aumento de 10,8% em relação à safra passada, e com possibilidades de crescer mais ainda na safra 2013/2014. No entanto, essas perspectivas crescentes de produção no setor agrícola podem ser comprometidas em decorrência dos problemas fitossanitários que os produtores brasileiros vêm enfrentando nas últimas safras, em virtude do aumento da resistência e tolerância dos defensivos com relação às pragas e doenças.

Dentre os fatores bióticos, as pragas constituem-se em elemento relevante, com perdas estimadas em cerca de dois bilhões de dólares anuais. Em meio a esse complexo de pragas, a lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (SILOTO, 2002) (Lepidoptera: Noctuidae), é considerada a mais voraz, pois sempre atinge o nível de dano econômico, atacando as plantas tanto na fase vegetativa quanto na fase reprodutiva (CRUZ, 1999; WAQUIL; VILLELA, 2003; AFONSO-ROSA; BARCELOS, 2012).

O uso indiscriminado de inseticidas orgânicos sintéticos desenvolvidos durante o último século tem colocado em risco a saúde humana e tem causado graves problemas ambientais. Preocupados com tais problemas, pesquisadores têm desenvolvido estratégias alternativas para o manejo de insetos pragas, e, dentre elas, o Manejo Integrado de Pragas (MIP) tem aberto uma visão mais racional sobre o uso de inseticidas e controle de pragas. O uso de microrganismos entomopatogênicos (controle microbiano), no controle desses insetos para o MIP, representa um avanço para uma agricultura mais equilibrada com o meio ambiente, principalmente em países de clima tropical, com vastas áreas plantadas, como é o caso do Brasil.

O controle microbiano apresenta vantagens como especificidade, multiplicação e dispersão do patógeno no ambiente, controle mais duradouro, além de serem não poluentes. É importante mencionar que os microrganismos entomopatogênicos não devem ser considerados os únicos agentes de controle de insetos. Esse tipo de controle deverá fazer parte de um conjunto de medidas que, atuando em harmonia com o ambiente, seja capaz de reduzir a população dos insetos pragas a níveis não econômicos.

De acordo com Jutsum (1998), do ponto de vista comercial, o maior potencial para o controle microbiano reside na utilização de bactérias e fungos, os quais podem ter custo efetivo de produção comparável aos dos químicos disponíveis no mercado. Apesar de todos os benefícios, somente alguns biopesticidas têm sido empregados.

O crescente interesse na utilização de bactérias entomopatogênicas para o controle de populações de insetos prejudiciais levou o homem a pesquisar mais profundamente as bactérias que formam os esporos, pois é uma característica de persistência e simplesmente um pré-requisito para que um agente possa ser produzido em escala comercial. Embora sejam conhecidas centenas de espécies de bactérias associadas com insetos, são poucas aquelas que possuem características que permitem

o seu uso no controle de insetos prejudiciais. As espécies de maior importância concentram-se nas famílias *Enterobacteriaceae* e *Bacillaceae*, além de alguns gêneros da ordem *Pseudomonadales* (HABIB; ANDRADE, 1998).

A família *Bacillaceae*, amplamente estudada, envolve dois gêneros de alta importância, *Bacillus* e *Clostridium* (HABIB; ANDRADE, 1986).

Dentre as bactérias com potencial de uso no controle biológico de insetos, destacam-se as do gênero *Bacillus*. Uma pesquisa que tem recebido atenção é o desenvolvimento de inseticidas com as toxinas de *Bacillus thuringiensis*. O seu uso é limitado, em parte pela alta especificidade e em parte por causa de sua moderada eficácia. Estudos para melhorar essas duas características têm sido feitos, aprofundando-se no entendimento da base molecular da seletividade e propriedades inseticidas de suas toxinas (GILL *et. al.*, 1992).

Apenas 1% das pragas da agricultura e vetores transmissores de doenças é controlado por compostos originários de organismos vivos. Entretanto, em mais de 30 anos como agente de controle biológico, o *Bacillus thuringiensis* é responsável por 90-95% desse mercado. A atividade entomopatogênica desse microrganismo deve-se à presença de uma inclusão cristalina produzida durante a esporulação. O cristal, composto por proteínas denominadas  $\delta$ -endotoxinas ou proteínas cristal (*Cry*), apresenta ação extremamente tóxica e altamente específica para larvas de insetos de três ordens: Lepidóptera, Díptera e Coleóptera. As toxinas contidas no cristal são virtualmente inócuas para o homem, os vegetais, os animais e outros invertebrados (VALADARES *et. al.*, 1998).

A utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle de insetos tem sido incrementada pelos avanços da engenharia genética. Os cristais tóxicos e os genes que codificam essas proteínas vêm sendo isolados e estudados quanto à regulação e expressão. O uso dessas tecnologias tem facilitado a clonagem desses genes e sua expressão em plantas, em sementes e em bactérias de solo, providenciando novos caminhos para a toxina chegar até os insetos. Esses novos desenvolvimentos em *Bacillus thuringiensis* controlando insetos, embora seguros para a saúde humana e ao ambiente compatíveis com outras práticas agrícolas, poderão encontrar problemas com resistência de insetos (GILL *et. al.*, 1992).

As novas tecnologias estão contribuindo inclusive para produzir microrganismos potencialmente úteis no controle biológico. O processo de melhoramento genético, visando produção de plantas transgênicas resistentes a insetos pela transferência de genes codificadores de toxinas provenientes de bactérias, já resultou em variedades comercializáveis, embora surjam problemas de resistência dos insetos às toxinas (AZEVEDO, 1998). A possibilidade de se explorar mais a diversidade encontrada nessa bactéria e espécies correlatas foram aventadas por Chilcott; Wigley (1994), que alertam para o fato de que vêm sendo encontradas linhagens ativas contra outros insetos que não os usualmente suscetíveis. Afirmando, ainda, que também há processos efetivos de seleção de isolados na natureza que precisam ser desenvolvidos.

Objetivou-se testar o efeito de mortalidade de cepas de *Bacillus* sp., realizando testes de patogenicidade em *Spodoptera frugiperda*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido no Laboratório de Genética e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Os bioensaios constituíram-se de 22 cepas de *Bacillus sp.* que foram comparadas aos tratamentos de controle negativo (água destilada) e de controle positivo (Dipel) *B. thuringiensis kurstaki*.

### 2.2 MATERIAL BIOLÓGICO

#### 2.2.1 *Spodoptera frugiperda*

Pupas de *Spodoptera frugiperda* foram fornecidas pelo Centro Nacional de Milho e Sorgo (CNPMS) – EMBRAPA, bem como pela criação mantida no Laboratório de Genética e Biotecnologia - GENE, do UNIPAM.

Para os testes de patogenicidade, foram utilizadas larvas de 1ª e 2ª instar, advindas da postura das mariposas após eclosão das pupas. Essas larvas foram alimentadas com dieta artificial.

A dieta utilizada na alimentação das larvas tem como base o feijão, e vem sendo usada no Departamento de Entomologia da ESALQ há alguns anos (KASTEN *et. al.*, 1978) com sucesso, cuja composição está descrita na Tabela 1. Essa quantidade é suficiente para 80 recipientes de criação (copinhos plásticos de 50 ml).

**TABELA 1:** Nutrientes utilizados em dieta artificial de *Spodoptera frugiperda*.

Componentes	Quantidade
Feijão	100,0 g
Levedura de cerveja	15,0 g
Ácido ascórbico	1,5 g
Metilparaidroxibenzoato (nipagin)	1,0 g
Ácido sórbico	0,5 g
Formaldeído (38%)	1,0 ml
Ágar (+ 250 ml de água)	12,0 g
Água	375,0 ml

Fonte: Kasten *et al.*, 1978

O feijão é cozido, sendo que a variedade Carioca é a que proporciona o melhor desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (PARRA; CARVALHO, 1984).

O preparo da dieta foi feito misturando-se os ingredientes, exceto o ágar, em água e batendo-se em liquidificador. O ágar é dissolvido separadamente em água em ebulição. A seguir, os dois conteúdos são misturados e homogeneizados por meio de um agitador elétrico, sendo a dieta transferida ainda quente para bandejas, onde, após seu completo resfriamento em câmara de fluxo laminar, são cobertas por folhas de papel alumínio e ficarão armazenadas em geladeira.

### 2.2.2 *Bacillus* sp.

As cepas de *Bacillus* sp. foram obtidas da coleção de bactérias do Laboratório de Genética e Biotecnologia - GENEb, do UNIPAM.

Alíquotas dessas cepas foram inoculadas em meio LB (Luria-Bertani), deixando em crescimento em câmara agitadora por 36 horas, a 25°C e 150 RPM.

O meio de cultura para *Bacillus* sp. foi preparado segundo Sambrook *et. al.* (1989), com algumas alterações. Para cada litro de meio, utilizou-se 1000 ml de água deionizada, 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl. Colocando-se os compostos em erlemeyer, adicionando 950 ml de água deionizada, dissolvendo bem, completando, então, com 50 ml de água deionizada. Lacrou-se o erlemeyer e levou-o ao autoclave por 15 minutos. Em seguida, levou-se o erlemeyer à câmara de fluxo, deixando a temperatura baixar a aproximadamente 50°C, adicionando-se, então, Penicilina G (7,5 mg/250ml).

### 2.3 TESTES DE PATOGENICIDADE

Para os testes de patogenicidade, foi seguida a metodologia utilizada pela EMBRAPA-CNPMS, que consiste em ministrar as larvas neonatas, tabletes (1x1 cm) de dieta artificial sem antibióticos, banhadas em suspensão da bactéria. Para cada cepa, deverão ser utilizadas 12 larvas.

As larvas foram individualizadas em recipientes de 50 ml, vedados com tampas de plástico e colocadas à temperatura de 25° C. Diariamente, foi observada a mortalidade larvária correspondente, anotando os resultados. Para cada cepa, foi observada a mortalidade durante todas as fases do inseto.

O experimento foi montado em Delineamento Inteiramente Casualizados (DIC), com doze repetições para cada cepa avaliada, contendo 12 lagartas no total. Todos os isolados foram submetidos à ANAVA e ao teste de Duncan a 5%.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testadas 22 cepas da coleção de bactérias do Laboratório de Genética e Biotecnologia - GENEb, que apresentaram percentual de mortalidade larval em *S. frugiperda* de 0,00 a 66,67% (Tabela 2). Essas mesmas cepas variaram o índice de mortalidade até a fase de pupa de *S. frugiperda* de 0,00% a 75,00% (Tabela 3). O *Bacillus* que atua por ingestão tem sua ação, inicialmente, limitada ao aparelho digestivo do inseto, porém, com a redução do pH intestinal, causada pela ação das toxinas Cry, os esporos disseminam-se pelo corpo do inseto, causando contaminação generalizada (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000).

Os resultados de mortalidade larval desse experimento apresentam percentagens similares aos trabalhos de Mendes *et. al.* (2009) e Logueiro *et. al.* (2001), com 13,64% das cepas com índice de 66,675 de mortalidade larval.

Os isolados 61 e 70 apresentaram incremento de mortalidade de 33,00% na fase de pupa. Provavelmente, a mortalidade nessa fase foi resultante de ação das toxinas presentes nas cepas, que interferiram na alimentação das lagartas. Os isolados 70, 72,

88 e 90 apresentaram mortalidade acima de 75,00% até a fase de pupa. Conforme observado por Viana *et al.* (2009), o aumento da mortalidade na fase de pupa possibilita a formulação de produto comercial para ser utilizado em programas de manejo integrado. Os isolados estudados influenciaram diretamente na biologia do inseto, interferindo desde a fase larval até a fase de pupas, o que vem de encontro com os trabalhos de Ramos *et al.* (2004) e Ibarra e Lópezmeza (1997).

**TABELA 2:** Percentual de mortalidade de larvas de *S. frugiperda* submetidas a cepas de *Bacillus* sp. coletadas na região do Alto do Paranaíba, Patos de Minas - MG.

Tratamentos	Mortalidade (%)	
Dipel	100.00	a
72	66.67	a b
88	66.67	a b
90	66.67	a b
64	50.00	b c
70	50.00	b c
77	50.00	b c
81	50.00	b c
84	50.00	b c
89	50.00	b c
62	41.67	b c d
69	41.67	b c d
86	41.67	b c d
61	33.33	b c d
63	33.33	b c d
66	33.33	b c d
76	33.33	b c d
80	33.33	b c d
67	25.00	b c d
68	25.00	b c d
87	16.67	c d
Test	8.33	c d
65	8.33	c d
74	0.00	d

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

**TABELA 3:** Percentual de mortalidade de *S. frugiperda*, submetidas a cepas de *Bacillus* sp., que não atingiram a fase adulta, Patos de Minas - MG

Tratamentos	Mortalidade (%)	
Dipel	100.00	a
90	75.00	a b
72	66.67	a b
88	66.67	a b c
64	50.00	a b c
70	50.00	a b c d
77	50.00	a b c d
81	50.00	a b c d
84	50.00	a b c d
89	50.00	a b c d e
62	41.67	a b c d e
69	41.67	a b c d e
86	41.67	a b c d e
61	33.33	b c d e
63	33.33	b c d e
66	33.33	b c d e
76	33.33	b c d e
80	33.33	b c d e
67	25.00	b c d e
68	25.00	c d e
Test	16.67	c d e
87	16.67	d e
65	8.33	e
74	0.00	e

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

#### 4 CONCLUSÃO

Das 22 cepas de *Bacillus* sp. testadas, os isolados 70, 72, 88 e 90 apresentaram mortalidade acima de 75,00% até a fase de pupa de *S. frugiperda*.

## REFERÊNCIAS

- AFONSO-ROSA, A. P. S.; BARCELOS, H. T. Bioecologia e controle de *Spodoptera frugiperda* em milho. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. *Embrapa Informação Tecnológica*, 2012. p. 9-10. (Embrapa Clima Temperado. Documentos 344).
- AZEVEDO, J. L. Engenharia genética aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, cap. 4, p. 262-285, 1998.
- \_\_\_\_\_. Controle microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético. In: MELO I. S.; AZEVEDO, J. L. *Controle Biológico*, v. 1. Piracicaba: Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, cap. 6, p. 312-324, 1998.
- CHILCOTT, C. N.; WIGLEY P. J. Opportunities for finding new *Bacillus thuringiensis* strains. *Agriculture Ecosystems Environment*, v. 49, p. 51-57, 1994.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. *Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo segundo levantamento, setembro 2013*. Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília – DF. 2013. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_09\\_10\\_16\\_05\\_53\\_boletim\\_portugues\\_setembro\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_09_10_16_05_53_boletim_portugues_setembro_2013.pdf)>. Acesso em: 14 de Setembro 2013.
- CRUZ, I. Lagarta-do-cartucho: enfrente o principal inimigo do milho. *Cultivar*, Pelotas, n.1, p.16-18, 1999.
- GILL, S. S.; COWLES, E. A.; PIETRANTONIO, P. V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology*, v. 37, p. 615-636, 1992.
- GLARE, TR; O'CALLAGHAN, M. *Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety*. Chichester: John Wiley & Sons. 350 p, 2000.
- HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias Entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo: Manole, 1986.
- \_\_\_\_\_. Bactérias Entomopatogênicas. IN: ALVES, S. B. *Controle microbiano de insetos*. 2ed. FEALQ, Piracicaba, SP, cap. 3, p. 230-261, 1998.
- IBARRA, J.; LÓPEZ-MESA, J. Desarrollo de resistencia a *Bacillus thuringiensis*. *Agrociencia*, Montecillo, v.31, p.121-131, 1997.
- JUTSUM, A. R. Commercial application of biological control: status and prospects. In: WOOD, R. K. S., WAY, M. J. ed. *Biological control of pests, pathogens and weeds: development and prospects*. London: The royal Society, London, p. 247-263, 1998.

- KASTEN, P. JR.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, v. 53 (1-2), p.68-78, 1978.
- LOGUEIRO, L. L.; SANTOS, M. R.; BARRETO, C.T.; GUIMARÃES, C.T.; PAIVA, E. Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a cry contituintion with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda*. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.32, p.362-367, 2001
- MENDES, L. S.; CARVALHO, L. A.; NAKAO, A. M.; OLIVEIRA, T. G. M.; CUNHA, W.V. Seleção de cepas de *Bacillus thuringiensis*, na região do Alto Paranaíba, para controle da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) *Perquirere*, Patos de Minas, v.6, p.09-16, 2009.
- PARRA, J. R. P.; S. CARVALHO, S. M. Biologia e nutrição quantitativa de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em meios artificiais compostos de diferentes variedades e feijão. *Anais da SEB*, v. 13(2), p.305-319, 1984.
- RAMOS, F.; CARMONA, A.; BÈRES, M.; MÉNDEZ, M. Evaluación de Aislamientos de *Bacillus thuringiensis* tóxicos a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Bioagro*, Venezuela, v.16, n.3, 183-188, 2004.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 453 p. 1989.
- SILOTO, R. C. *Danos e biologia de Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em genótipos de milho. 2002. 93 p. Dissertação (Mestrado em entomologia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- VALADARES, M. C. C.; SHILER, W.; DE-SOUZA, M. T.. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Controle Biológico*, v. 1, 262, p., 1998.
- VIANA, C.L.T.P.; DE BORTOLI, S.A.; THULER, R.T.; GOULART, R.M.; THULER, G.A.M.; LEMOS, M.V.F.; FERRAUDO, A.S. *Effect of Bacillus thuringiensis Berliner new strains against Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) *Científica*, Jaboticabal, v.37, n.1, p.22 - 31, 2009.
- WAQUIL, J. M.; VILELLA, F. M. F. Gene bom. *Revista Cultivar*, Pelotas, v.49, p.22-26, 2003.