

Seleção de cepas de *Bacillus thuringiensis*, na região do Alto Paranaíba, para controle da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*)

Lucas da Silva Mendes

Leandro Alves de Carvalho

André Mazzi Nakao

Talitha Gonçalves Mendonça Oliveira

Graduandos do curso de Agronomia do UNIPAM

Walter Vieira da Cunha

Professor adjunto do UNIPAM e orientador do estudo

Resumo

A lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, (Lepidoptera: Noctuidae) é conhecida por ser a principal praga da cultura do milho (*Zea mays* L.). O seu ataque ocorre em todos os estádios do milho, podendo causar perdas na produção de até 34%. O controle biológico a base de bactérias entomopatogênicas tem sido utilizado em larga escala em diversos programas de controle de pragas com grande sucesso. Desta forma, o trabalho teve como objetivo selecionar cepas de *Bacillus thuringiensis* do Alto Paranaíba para o controle da *Spodoptera frugiperda*. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias do UNIPAM, em Patos de Minas-MG. Foram selecionadas 385 cepas de *Bacillus thuringiensis* oriundas de amostras de solos da região do Alto Paranaíba - MG. Para cada cepa, os bioensaios foram montados com duas repetições, além do controle negativo (água destilada) e do controle positivo com a cepa 344-EMBRAPA/CNPMS. As repetições foram constituídas por 24 lagartas (1.º instar). Adotou-se como critério de avaliação na eficiência toxicológica de cada cepa a porcentagem de mortalidade dos insetos testados. Foram identificadas cinco cepas com eficiência de controle, variando de 77,0% a 100%. Pela interpretação dos resultados concluiu-se que as cepas autóctones apresentam efeito sobre a *Spodoptera frugiperda*, e podem ser usadas como um instrumento efetivo para se reduzirem os custos com produtos químicos e, assim, minimizar o impacto ambiental.

Palavras-chave: *S. frugiperda*. *Zea mays* L. *B. thuringiensis*. Controle biológico

Abstract

The fall-armyworm, *Spodoptera frugiperda*, (Lepidoptera: Noctuidae) is known to be the main scourge of the corn crop (*Zea mays* L.). The attack occurs at all stages of corn and may cause losses in the production of up to 34%. The biological control of the base entomopathogenic bacterium has been used in several large-scale programs to control pests with great success. Thus the present study aimed at selecting pathogenic strains of *Bacillus thuringiensis* to *Spodoptera frugiperda*. The experiments were conducted at the Laboratory of Genetics and Biotechnology of the Faculty of Agrarian Sciences (UNIPAM), in Patos de Minas, Brazil. We selected 385 strains of *Bacillus thuringiensis* from samples of soil from Alto Paranaíba, MG. For each strain, the bioassays were fitted with two repetition of negative control (distilled water) and positive control strains 344-EMBRAPA/CNPMS. The repetitions were made of 24 caterpillars (1st call). The criterion used for assessing toxicological efficiency of each strain was the percentage of mortality of the insects tested. Five strains showed efficiency of control, with mortality rates ranging from 77.0% to 100%. By interpreting the results, it can be assumed that the indigenous strains have effect on *Spodoptera frugiperda* and can be used as an effective tool to reduce costs with chemicals thus minimizing environmental impact.

Key-words: *Spodoptera frugiperda*, *Zea mays* L. Bacterium, Biological control

1. Introdução

A lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, (Lepidóptera: Noctuidae) é uma das principais pragas do milho no Brasil. O seu ataque ocorre em todos os estádios do milho, podendo causar perdas na produção de até 34%. As larvas mais novas consomem tecidos de folha de um lado, deixando a epiderme oposta intacta. Depois do segundo ou terceiro instar, as larvas começam a fazer orifícios nas folhas, alimentando-se em seguida do cartucho das plantas de milho e produzindo uma característica fileira de perfurações nas folhas (EMBRAPA, 2005).

Essa lagarta tem sido controlada com inseticidas químicos sintéticos, de elevada toxicidade para o homem e para o meio ambiente, além do alto custo econômico. A *S. frugiperda* pode sofrer a ação de patógenos como as bactérias, que são agentes utilizados no controle microbiano. As bactérias têm se destacado por várias características que favorecem a sua produção e manejo. Dentre as bactérias utilizadas no controle biológico, o *Bacillus thuringiensis* é responsável por 90%-95% do mercado de bioinseticidas (VALADARES-INGLIS et al., 1998) e apresenta ampla distribuição, podendo ser encontrado em praticamente todos os ambientes. Além disso, produz diferentes proteínas tóxicas, denominadas cristais, altamente específicas para os insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, e Diptera e não afetam o homem, os animais e as plantas (PRAÇA et al., 2004).

O controle microbiano apresenta vantagens como especificidade, multiplicação e dispersão do patógeno no ambiente e por não ser poluente. É importante mencionar que os microorganismos 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 econômicos (CUNHA, 1999).

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) desempenha papel fundamental no controle dos principais insetos pragas de cada cultura. O MIP pode ser definido como o uso de várias técnicas de controle de insetos, além de preservar e aumentar os fatores de mortalidade natural, mantendo a população das pragas em níveis abaixo daqueles capazes de causar dano econômico. Dentro do MIP usam-se técnicas de controle de insetos que incluem o uso de produtos químicos, práticas culturais, parasitoides, predadores, nematoides, protozoários e patógenos, entre os quais destaca-se o *B. thuringiensis*. O MIP tem promovido ganhos significativos de produtividade em várias culturas, entre as quais se destacam as culturas do milho, do algodão e da cana (VALICENTE, 2008).

O *B. thuringiensis* é uma bactéria aeróbia, gram-positiva, da família Bacillaceae que se caracteriza pela produção, no momento de sua esporulação, de inclusões proteicas cristalinas. Estas inclusões se distinguem como cristais de formas definidas por microscopia de contraste de fases. As colônias de *B. thuringiensis* têm tamanho médio, coloração esbranquiçada a creme, opaca e com bordas irregulares (MELO; AZEVEDO, 2000).

Atualmente, devido ao grande número de genes que são estudados e sequenciados, usam-se números arábicos: *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4* até *cry50*. Devido ao grande número de coleção de *B. thuringiensis* no mundo, a atualização dos genes é feita através da internet (http://www.biols.susx.ac.uk/Neil_Crickmore/Bt/). Estimou-se em mais de 60.000 as cepas de *B. thuringiensis* em todo mundo e esse patógeno vem sendo usado como bioinseticida há décadas (VALICENTE, 2008).

Após a ingestão do *B. thuringiensis* pelo inseto, os cristais são solubilizados em pH alcalino, as protoxinas, que em presença de enzimas digestivas (proteínases), são convertidas em quatro ou mais polipeptídeos tóxicos (δ -endotoxinas). Essas toxinas hidrolizadas atravessam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos localizados na membrana apical, formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana. O aumento na absorção de água causa lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio. A lagarta do cartucho pode morrer por inanição, uma vez que pouco tempo após a infecção, o inseto cessa a alimentação (COPPING; MENN, 2000).

A busca de novas cepas com características desejáveis, tais como maior abrangência de atuação e toxicidade alta para insetos pragas, tem levado pesquisadores a utilizar as ferramentas da biologia molecular com a intenção de agilizar este processo.

Por isso, a seleção de cepas de *B. thuringiensis* patogênicas à *S. frugiperda* é de grande relevância, tendo em vista que posteriormente elas podem ser úteis na forma de produtos aplicáveis, como biopesticida, para o controle de pragas, ou que podem ter seus genes introduzidos em plantas.

Assim, o presente estudo científico foi desenvolvido visando à seleção de cepas de *B. thuringiensis* em amostras de solo de diferentes municípios do Alto Paranaíba e posterior teste de patogenicidade à *S. 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 100 cepas de *B. thuringiensis* que foram comparadas aos tratamentos de controle negativo (água destilada) e de controle positivo (cepa 344) *B. thuringiensis tolworthi* do Banco de Microorganismos da Embrapa Milho e Sorgo.

2.2. Material biológico:

- *B. thuringiensis*

As cepas de *B. thuringiensis* foram extraídas de amostras de solo, oriundas da região do Alto Paranaíba-MG, obtidas no Laboratório de Solos da Terrena Agronegócios Ltda. Para extração de *B. thuringiensis* utilizou-se a metodologia empregada na EMBRAPA/CNPMS com algumas alterações. Pesou-se 1 g da amostra de solo e adicionaram-se 5 mL de solução salina (0,8g NaCl L⁻¹), deixando agitar por 12 horas. Homogeinizou-se em vórtex por 1 minuto deixando decantar. Transferiu-se então 1 mL da suspensão para microtubos e incubou-se em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Deu-se o choque térmico e em seguida plaqueou-se 200 µL em meio LB. Incubou-se a 28°C por 36 horas. Analisaram-se as colônias que cresceram, separando as que apresentaram diferença visual na mesma placa para outras placas de *petri* seguindo a orientação de Melo e Azevedo (2000). Deixou-se em crescimento por mais 36 horas a 28°C. Em seguida fez-se a raspagem da bactéria presente na placa de *petri*, transferindo-a para micro tubos contendo água destilada. Em seguida foram mantidas a uma temperatura de -20°C.

O meio de cultura LB (Luria-Bertani) utilizado para extração de *B. thuringiensis* foi preparado seguindo Sambrook et al. (1989) com algumas alterações. Para a formulação de 1L de meio LB, utilizou-se 1000 mL de água deionizada, dez g de triptona, cinco g de extrato de levedura e dez g de NaCl. Colocaram-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, levando-o à autoclave por 15 minutos. Em seguida, levou-se o erlemeyer à câmara de fluxo, deixando a temperatura baixar a aproximadamente 50°C, adicionou-se então Penicilina G (7,5 mg/250 mL). Para meio sólido, utilizou-se bactoágar (12 g/L⁻¹), sendo adicionado antes de autoclavar.

- *S. frugiperda*

A criação de *S. frugiperda* foi realizada conforme Barreto et al. (1999) para fornecimento de larvas de primeiro e segundo “instars”. Essas larvas foram utilizadas nos testes de patogenicidade. As pupas de *S. frugiperda* para início da criação foram fornecidas pela EMBRAPA/CNPMS. Na fase larval a *S. frugiperda* foi mantida em copos plásticos (100 mL) e na fase de mariposa utilizou-se gaiola telada medindo 80 cm x 100 cm. A dieta artificial utilizada para alimentação de *S. frugiperda* tem como base o feijão e segue a metodologia do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-ESALQ (KASTEN et al., 1978).

Teste de patogenicidade:

Para a realização do teste de patogenicidade, as amostras da bactéria que estava sob a temperatura de -20°C foram colocadas em temperatura ambiente, durante o período de

uma hora. Em seguida a amostra foi transferida para erlemeyer contendo 200 mL de meio LB líquido previamente preparado e sem a utilização bactoágar. Deixou-se então agitar a 200 rpm por 24 horas adquirindo assim a solução de inóculo.

As larvas foram colocadas, individualmente, em copos plásticos (100 mL), vedados com tampas, contendo dieta artificial cortada em cubo já inoculada com o correspondente tratamento. A avaliação de mortalidade foi feita cinco dias após a montagem dos biosensaios.

O experimento foi montado em Delineamento Inteiramente Casualizados (DIC) com duas repetições para cada cepa avaliada, contendo 48 lagartas no total. Todos os isolados foram submetidos à ANAVA e a Teste de Tukey a 5%.

3. Resultados e discussão

Foram selecionadas 385 cepas que apresentaram características visuais, seguindo orientação de Melo e Azevedo (2000). Destas testaram-se 100 cepas que apresentaram uma porcentagem de mortalidade de 0,00 a 100%, sobre as lagartas ensaiadas (Tabela 1).

TABELA 1: Valores médios de mortalidade de *S. frugiperda* submetidas a testes de mortalidade com cepas de *B. thuringiensis* coletadas na região do Alto do Paranaíba–MG (FACIAGRA/UNIPAM, 2008).

CEPAS	MÉDIA*	CEPAS	MÉDIA
Água	0,7071 A	102	2,5662 A B C
96	0,7071 A	102	2,5662 A B C
107	0,7071 A	74	2,5662 A B C
108	0,7071 A	24	2,5662 A B C
123	0,7071 A	346	2,5869 A B C
98	0,7071 A	44	2,5869 A B C
165	0,7071 A	375	2,5963 A B C
138	0,7071 A	249	2,6493 A B C
99	0,7071 A	339	2,8829 A B C
157	0,7071 A	32	2,8829 A B C
4	0,7071 A	315	2,8829 A B C
56	0,7071 A	135	2,9721 A B C
34	0,7071 A	21	2,9721 A B C
325	0,7071 A	369	3,0324 A B C
317	0,7071 A	342	3,2888 A B C
371	0,7071 A	13	3,2888 A B C
9	0,7071 A	17	3,2888 A B C
38	0,7071 A	15	3,2888 A B C
324	0,7071 A	48	3,2888 A B C
328	0,7071 A	18	3,3190 A B C
112	1,4337 A	348	3,3563 A B C
122	1,4337 A	340	3,3885 A B C
113	1,4337 A	319	3,4284 A B C
79	1,4337 A	60	3,5577 A B C
64	1,4337 A	315	3,6311 A B C
67	1,4337 A	36	3,6428 A B C
65	1,4337 A	361	3,6428 A B C

321	1,4544	A	334	4,0109	A B C
3	1,4544	A	374	4,1433	A B C D
104	1,4767	A	373	4,4728	A B C D E
58	1,4767	A	309	4,5190	A B C D E
327	1,8396	A B	49	4,6188	A B C D E
372	1,8396	A B	350	4,6204	A B C D E
309	1,8396	A B	62	4,6930	A B C D E
166	1,8396	A B	326	4,7158	A B C D E
75	1,8396	A B	376	4,7499	A B C D E
68	1,8396	A B	328	4,8343	A B C D E
10	1,8396	A B	329	5,0328	A B C D E F
11	1,8396	A B	387	5,0813	A B C D E F
28	1,8396	A B	360	5,2131	A B C D E F
397	1,8396	A B	145	5,3916	B C D E F
37	1,8396	A B	209	5,4332	B C D E F
327	1,8396	A B	30	6,3767	C D E F G
372	1,8698	A B	233	7,9905	D E F G
382	1,8698	A B	46	8,1022	E F G
315	1,9366	A B	2	8,8010	F G
102	2,1602	A B	33	8,8010	F G
5	2,1602	A B	31	8,8073	F G
291	2,2018	A B	73	9,4809	G
7	2,4252	A B	146	10,0250	G
368	2,5662	A B C	344		
			EMB	10,0250	G

*As médias seguidas da mesma letra não se diferem entre se pelo teste de Tukey a 5%.

Os dados foram transformados por terem apresentado valores extremos de mortalidade, variando de 0 e 100%. Segundo Haddad e Vendramim (2000), em muitos experimentos, os resultados, traduzidos por frequências, podem ser expressos em porcentagens, que se devem comparar. Na área de Entomologia, isso é usual quando, por exemplo, se avalia a variável mortalidade. É comum, nesses casos, que, antes da análise de variância, os dados expressos em porcentagem (P%) sejam transformados pela fórmula $X = \sqrt{x+0,5}$. Nesse caso, essa transformação homogeneizará a variância experimental, que é uma das exigências estatísticas para a validade dos testes de significância e dos intervalos de confiança para as médias dos tratamentos.

Os níveis de eficiência contra a *S. frugiperda* foram obtidos por bioensaios envolvendo os 100 isolados. Na tabela 2, cinco isolados (5%) promoveram mortalidade variando de 77,00 a 100% nas larvas. Esses índices são considerados superiores quando comparados aos relatados por Loguercio et al. (2001), que obtiveram baixa porcentagem de isolados, cerca de 3%, considerando ainda o mínimo de 75% de mortalidade das larvas como índice para alta toxicidade.

As cepas que apresentaram eficiência sobre a *S. frugiperda* estão presentes nas amostras de solos correspondentes às cidades de Carmo do Paranaíba, Paracatu e Morada Nova, que representaram uma mortalidade de 77,1, 89,4 e 100% respectivamente. Segundo Valicente e Barreto (2003) as cepas selecionadas são consideradas eficientes quando a mor-

talidade for superior a 75%. Tais cepas necessitam ser caracterizadas molecularmente por meio da técnica de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), para se determinar a sua especificidade quanto à ordem de insetos sobre a qual atua. A PCR é uma das técnicas mais usadas na caracterização de cepas de *B. thuringiensis* (VALICENTE et al., 2000).

Comparando os dados da Tabela 2, ao Banco de Microorganismo da Embrapa Milho e Sorgo, os resultados são promissores. Segundo Valicente e Barreto (2003), até o presente momento, foram coletadas 1755 amostras de solos de 10 diferentes estados brasileiros, abrangendo quatro diferentes regiões, com um total de 4500 cepas. Desse total, apenas 149 cepas apresentaram mortalidade acima de 75%, fazendo com que pouco mais de 3% das cepas testadas sejam eficientes contra a *S. frugiperda*.

TABELA 2: Números de cepas testadas e a mortalidade (%) de *S. frugiperda* submetidas a cepas *B. thuringiensis*

Nº de cepas	% de mortalidade
19	0
45	2,1 a 8,7
31	10,4 a 63,8
5	77,1 a 100,0

Dados do experimento

Perante a testemunha positiva utilizada, representada pela cepa 344 (*B. thuringiensis tolworthi*), e a testemunha negativa representada pela água destilada, cinco cepas obtidas das amostras de solo da região do Alto Paranaíba-MG se apresentam eficientes no controle da *S. frugiperda*. Hernandez (1988) testou 13 sorovarietades de *B. thuringiensis* em larvas *S. frugiperda* e relatou que as *B. thuringiensis galleriae*, *B. thuringiensis aizawai* e *B. thuringiensis tolworthi* mataram acima de 90%. Esses dados foram parcialmente confirmados por Valicente (2008), em que apenas a subespécie *B. thuringiensis tolworthi* matou acima de 95%. Valicente et al. (2008) testaram mais de 400 cepas contra as principais pragas da cultura do milho e os resultados mostraram que 99% dos isolados causaram mortalidade abaixo de 50%. Esses números são importantes porque mostram a dificuldade de se encontrar isolados de *B. thuringiensis* eficientes no controle *S. frugiperda*.

4. Conclusão

Foram selecionadas 385 cepas de *B. thuringiensis* nas amostras de solo da região do Alto Paranaíba-MG. Destas, testaram-se 100 dentre as quais cinco se mostraram mais eficientes no controle da *S. frugiperda*.

Referências

- BARRETO, M. R.; LOGUERCIO, L. L.; VALICENTE, F. H.; PAIVA, E. Insecticidal activity of culture supernatants from *Bacillus thuringiensis* berliner strains against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) larvae. *An. Soc. Entomol.*, v. 28, p. 675-685, 1999.
- COPPING, L. G.; MENN, J. J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, v.57, n.º.5, p. 651-676,200, in: Polanczyk, R.; Alves, S. *Bacillus thuringiensis: uma breve revisão. Agrociência*, v.7, n.2, p.1-10, 2003.
- CUNHA VIEIRA, Walter. *Mapeamento geográfico da ocorrência de cepas de Bacillus thuringiensis no Triângulo Mineiro e sua caracterização molecular*. 1999. 120 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.
- HADDAD, M.L.; VENDRAMIM, J.D. Comparação de porcentagens observadas com caso extremo de 0 e 100%. *An. Soc. Entomol.*, v. 29, p. 835-837, 2000.
- KASTEN JÚNIOR, P.; 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*, v. 53, 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.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Controle biológico*. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 388p. 2000.
- PRAÇA, L.B. et al. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004.
- SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- VALADARES, M. C. C.; SHILER, W.; SOUZA, M. T. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico, in: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (ed.). *Controle biológico*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. v. 1. p. 201-230.
- VALICENTE, F.H.; BARRETO, M.R. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activiy against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidadae). *Neotropical Entomology*, p. 32639-32644, 2003.
- VALICENTE, F. H. Biopesticidas para o controle da lagarta do cartucho, *spodoptera frugiperda*, in: VENZON, M.; JÚNIOR, T. J. P.; PALLINI, A. *Avanços no controle alternativo de pragas e doenças*. Viçosa, EPAMIG-CTZM, 2008. cap. 2, p. 31-52.
- VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R.; VASCONCELOS, M. J. V.; FIGUEIREDO, J. E. F.; PAIVA, E. Identificação através de PCR dos genes *cryI* de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidadae). *An. Soc. Entomol.*, v. 29, p.47-153, 2000.
- VALICENTE, F. H. Pesquisas com milho transgênico avançam na Embrapa. EMBRAPA/CPNMS, fev. 2005.
Disponível em: < www.embrapa.br/imprensa/noticias/2005/fevereiro/noticia > Acesso em: 08 jul. 2008.