

APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DA BACTÉRIA *Bacillus thuringiensis* NO CONTROLE BIOLÓGICO DA LAGARTA DO CARTUCHO *Spodoptera frugiperda*

Francylli Regina Costa Becheleni^{*}
Mariana Lázaro Sales^{**}
Mariana Lourenço Campolino^{***}

RESUMO

A bactéria do solo *Bacillus thuringiensis* é amplamente utilizada no controle biológico e apresenta toxicidade contra várias espécies de insetos através da produção de δ -endotoxinas. O intuito do presente trabalho foi avaliar e analisar a bactéria como potencial agente de controle biológico da lagarta *Spodoptera frugiperda*, aplicando a técnica de bioensaio. O experimento foi conduzido no laboratório de Controle Biológico - Núcleo NBA da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas/MG. Foram selecionadas 24 cepas de *Bt*, cultivadas em meio LB acrescido de sais líquido por 48 horas a 28°C. Para cada cepa, bioensaios foram montados utilizando-se água destilada, como controle positivo. Cada repetição foi constituída por 24 lagartas de segundo ínstar. Foram avaliadas as eficiências toxicológicas e biológicas de cada cepa através da contagem da mortalidade dos insetos. 19 cepas apresentaram uma mortalidade de 4,2% a 25,0%, inclusive o controle positivo do experimento, 4 cepas apresentaram uma mortalidade de 29,0% a 42,0%. A cepa que demonstrou maior eficiência no controle foi a HD1 subespécie *Kurstaki* com 75,0%, onde foi analisada morfologicamente e através de PCR sendo verificada a presença das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, codificadas pelos genes *cry1Aa*, *cry1Ab* e *cry1Ac*. Os resultados indicam que cepas que apresentam efeitos sobre a *S. frugiperda*, podem ser usadas efetivamente no controle biológico e que a preservação adequada desses microrganismos é de grande interesse para instituições de pesquisa, para o agronegócio e também para o meio ambiente.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*. *Spodoptera frugiperda*. Controle biológico. Cepas.

ABSTRACT

The soil bacterium *Bacillus thuringiensis* is widely used in biological control and shows toxicity against several species of insects through the production of δ -endotoxins. The objective of this work was to evaluate and analyze the bacterium as a potential biological control agent of the *Spodoptera frugiperda* caterpillar, applying the bioassay technique. The experiment was carried out at the Biological Control Laboratory - Embrapa Maize and Sorghum NBA Nucleus in Sete Lagoas/MG. Twenty four *Bt* strains were cultured in LB medium supplemented with liquid salts for 48 hours at 28°C. For each strain, bioassays were assembled using distilled water as a positive control. Each replicate consisted of 24 second instar caterpillars. The toxicological and biological efficiencies of each strain were evaluated by counting insect mortality. 19 strains had a mortality of 4.2% to 25.0%, including the positive control of the experiment, 4 strains had a mortality of 29.0% to 42.0%. The strain that showed the highest efficiency in the control was HD1 subspecies *Kurstaki* with 75.0%, it was analyzed morphologically and through PCR to verified the presence of the proteins Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac, codified by the genes *cry1Aa*, *cry1Ab* and *cry1Ac*. The results indicate that strains that have effects on *S. frugiperda* can be used effectively in biological control and that the adequate preservation of these microorganisms is of great interest for research institutions, agribusiness and also for the environment.

Key-words: *Bacillus thuringiensis*. *Spodoptera frugiperda*. Biological control. Strains.

* Graduanda em Biotecnologia pela Faculdade Ciências da Vida (FCV).

E-mail: francylliregina@yahoo.com.br/francyllibecheleni@outlook.com

** Professora co-orientadora, Doutoranda em Ciências Animais pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). *E-mail:* mariana.lazarosales@gmail.com

*** Professora orientadora, Mestranda em Biotecnologia e Gestão da Inovação (UNIFEMM/EMBRAPA).

E-mail: mlcampolino@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O milho *Zea mays* L., da família Poaceae, é considerado um dos cereais mais relevantes para a agricultura de diversos países, sendo um dos alimentos mais consumidos pelas populações, devido as suas ótimas qualidades nutricionais, como os sais minerais e as vitaminas. O Brasil é considerado um país de clima tropical em que os setores da economia estão relacionados e totalmente ligados à agricultura, com cerca de 84 milhões de toneladas colhidas em 2014/2015, perdendo somente para a China e os Estados Unidos considerados os países que mais produzem e exportam esses grãos. Para o Brasil é esperado que 86 milhões de toneladas de milho sejam colhidas em 2015/2016, número que está em linha com o projetado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2016).

Os agricultores devem estar atentos à observação de alguns fatores que podem afetar o crescimento e a produção do milho, como a temperatura, a luminosidade, a qualidade do solo e o déficit hídrico, para controlar ou minimizar esses prejuízos. Outro fator considerado muito desfavorável e de elevada participação, é a incidência de pragas como a lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), considerada a principal praga das lavouras de milho e responsável por causar grandes perdas econômicas na produção alimentar (LIMA JR, 2012).

O desenvolvimento biológico deste inseto em laboratório é completado em 30 a 40 dias, em cada postura colocada por uma fêmea, nos 4 a 5 primeiros dias o número de ovos pode sofrer uma variação de 1.500 a 2.000. As larvas recém-eclodidas apresentam o corpo claro e a cabeça escura e o corpo vai escurecendo após os 3 dias de desenvolvimento, em 13 a 15 dias seu período larval é completado. As larvas desenvolvidas medem até 35 mm de comprimento com as cores variando de marrom claro a marrom escuro, apresentam uma protuberância na cabeça em forma de ‘Y’. As pupas são formadas em 8 a 10 dias, medindo de 14 a 18 mm de comprimento e 4,5 mm de largura, com uma coloração marrom avermelhada. Adultos medem de 32 a 40 mm, machos e fêmeas apresentam coloração acinzentada, e o que difere um macho de uma fêmea é um ponto dourado que apresentam na asa anterior. São insetos de hábito noturno, são mais ativos em noites quentes (VALICENTE *et al.*, 2015).

A lagarta *S. frugiperda* é considerada a principal praga do milho em diversas regiões do Brasil, México, América Central e América do Sul, havendo vários relatos de sua ocorrência (ROSA *et al.*, 2012). Em praticamente todos os estágios de desenvolvimento do milho os ataques são relatados, começando desde a emergência da planta até o aparecimento

das espigas, a lagarta ataca preferencialmente o cartucho, até destruí-lo por completo. Seus danos podem causar grandes perdas na produtividade, atingindo até 60%, dependendo de alguns fatores como: o desenvolvimento da planta, a época, o local e o manejo adotado (PETERLINI *et al.*, 2014).

Segundo Santos *et al.*, (2004) citado por Melo *et al.*, (2014) a importância da lagarta *S. frugiperda* não se deve somente aos danos, mas em especial à dificuldade de seu controle. Deste modo, torna-se necessário o estudo sobre o conhecimento dos parâmetros populacionais da praga, como seu padrão de dispersão na cultura, para desenvolver táticas mais econômicas, eficazes e sustentáveis de controle. Um programa muito utilizado e com alto destaque que proporciona melhoria nas populações é o Manejo Integrado de Pragas - MIP, técnica definida como a utilização de ações altamente favoráveis para o controle de pragas. Esse programa é eficaz para o monitoramento de insetos que ocorrem na cultura, sendo de fundamental importância para a decisão de quando deverá ser adotado e o que deve ser aplicado às lavouras (VALICENTE *et al.*, 2015).

O controle dos insetos-praga na agricultura é realizado com o emprego de inseticidas químicos, mas podem ocasionar riscos graves ao meio ambiente e as populações se forem usados em elevadas quantidades, devido à composição tóxica e sua ação. Alguns problemas podem ser encontrados pelo uso desses produtos como: os danos à saúde dos agricultores devido a elevada toxicidade, a resistência adquirida dos insetos às substâncias o que leva ao uso de elevadas concentrações de produtos, não degradam com facilidade e podem se acumular no ambiente eliminando os predadores naturais (CAMPANINI *et al.*, 2012; FINKLER, 2012). Para controlar os efeitos gerados por esses inseticidas, torna-se necessário a adoção de práticas sustentáveis de controle, que possam contribuir na redução dos impactos ambientais e sociais causados por esse modelo convencional de produção agrícola (PESSOA *et al.*, 2014).

Uma alternativa para a limitação dos inseticidas químicos nas lavouras é investir na utilização dos produtos de origens biológicas, dentre eles destacam-se o microrganismo entomopatogênico *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) (Eubacteriales: Bacillaceae). Em 1902 no Japão, um pesquisador isolou uma bactéria a partir da lagarta *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae), onde foi constatado se tratar de uma subespécie de *B. thuringiensis*. Alguns anos depois no estado de Thuringia na Alemanha, a bactéria foi descoberta e descrita em pesquisas, através do isolamento da lagarta *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) (GALZER; AZEVEDO FILHO, 2016).

A bactéria *B. thuringiensis* apresenta como vantagens: menos riscos ambientais e à saúde humana e é economicamente viável, e como desvantagem ela é susceptível às diversas condições ambientais, o que pode ser amenizado e controlado com vários estudos, com o objetivo de transformá-los mais resistentes ou duradouros às mudanças ambientais, prolongando seu tempo de prateleira. É uma bactéria Gram positiva, aeróbia e natural do solo, com células vegetativas móveis de 1,0 a 1,2 µm de largura por 3,0 a 5,0 µm de comprimento, o esporo dessa bactéria localiza-se no interior da célula mãe. Apresenta uma faixa de temperatura e crescimento entre 28°C a 30°C. É uma bactéria que apresenta um grande complexo enzimático, o que permite a utilização de uma variedade de substratos (CONSTANSKI *et al.*, 2015).

B. thuringiensis se destaca por produzir inclusões protéicas cristalinas em fase de esporulação ou durante sua fase estacionária, momento onde há uma alta taxa de desenvolvimento e multiplicação desse microrganismo. As composições dessas bactérias são por proteínas chamadas de δ- endotoxinas: Cry, Cyt e Vip que são codificados por variados genes: *cry*, *cyt* e *vip*, possuindo atividade tóxica aos mais variados insetos de importância e interesse agrônomo, como grupos de lepidópteros, coleópteros, dípteros, orthopteros e hemípteros, e alguns de invertebrados como os nematoides, ácaros e protozoários (VALICENTE *et al.*, 2015; CONSTANSKI *et al.*, 2015).

Essas proteínas Cry sofrem uma clivagem proteolítica no intestino médio dos insetos quando solubilizadas no aparelho digestivo alcalino, ativando a toxina que é liberada no organismo. O domínio responsável pelo reconhecimento se liga então de forma irreversível ao receptor específico na parede do intestino alvo. Após a ligação, a proteína provoca paralisia da musculatura intestinal do inseto, onde ocorre uma inibição da absorção dos alimentos e a presença de poros nas membranas do intestino o que leva ao desequilíbrio osmótico das células, momento em que os insetos já não conseguem mais se alimentar, o que os levam a morte. Esse fenômeno é conhecido como septicemia. As proteínas apresentam especificidade devido à diversidade desses receptores nas diferentes espécies, ordens e classes de insetos (COSTA; QUEIROZ, 2014).

Como técnicas de controle pelo uso de *B. thuringiensis*, podemos citar os bioensaios, que são estudos realizados em laboratório, e que apresentam como finalidade selecionar estirpes mais eficazes de controle para os insetos. A eficácia pode ser avaliada através dos testes de patogenicidade contra *S. frugiperda*. E aquelas cepas que apresentam uma maior atividade inseticida podem ser submetidas a novos testes para determinação de seu controle. A caracterização bioquímica e molecular pode ser realizada através da técnica de Reação em

Cadeia da Polimerase - PCR indicando a composição protéica e perfil de genes *cry*, o que explica a patogenicidade dessas estirpes de bactérias (VALICENTE *et al.*, 2015; CONSTANSKI *et al.*, 2015). Atualmente a cada clonagem, os autores atualizam os genes *cry*, que são classificados em grupos de proteínas Cry, em um Comitê de Nomenclatura de toxinas de *B. thuringiensis*. Essas informações ficam armazenadas e disponíveis no site: www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore (CRICKMORE *et al.*, 2016).

Para o grande sucesso da produção tanto em escala laboratorial como em escala comercial da bactéria *B. thuringiensis* é sempre necessário à atenção ao preparo do meio de cultura como a escolha adequada de componentes essenciais para a obtenção de produtos altamente desejáveis, como os substratos de baixo custo, os sais minerais, as excelentes fontes de nitrogênio e de carbono o que se deve a uma maior atividade tóxica por volume de fermentação realizada (FINKLER, 2012). A escolha de um método eficaz de controle com o uso de *B. thuringiensis* deve proporcionar uma elevada produção com o mínimo custo de reagentes. Alguns parâmetros que podem ser verificados durante o processo são: a temperatura, o pH e a taxa de oxigênio dissolvido que é influenciado no processo pelas taxas de aeração e agitação. O *B. thuringiensis* é um destaque para controlar os insetos, pois apresenta excelente característica biológica (VALICENTE *et al.*, 2015).

O investimento nos setores de controle biológico e novas tecnologias para os agricultores e grandes empresas especializadas, tem apresentado cada vez mais uma alternativa econômica e viável, apresentando vantagens em relação ao controle químico. Os produtos não apresentam riscos ao homem e podem ser multiplicados e dispersos no ambiente sendo capazes de produzirem alguns efeitos positivos às populações, ou seja, podem reduzir a oviposição e aumentar a sensibilidade a diferentes agentes de controle, além disso, são produtos específicos que não ocasionam efeitos maléficos aos inimigos naturais (FINKLER, 2012). A biotecnologia e a agricultura apresentam tecnologias modernas, que nos permitem fazer identificação e seleção de genes específicos, para que possam codificar características benéficas como ferramenta de controle e manejo efetivo de *S. frugiperda* para reduzir os impactos, através da sua ação nas lavouras ou a utilização de produtos químicos que afetariam o ambiente (GATTI *et al.*, 2012; PETERLINI *et al.*, 2014).

Métodos para o controle e a prevenção de danos agrônômicos, visando o controle de insetos, são de grande relevância para a agricultura e o mercado do país. O presente trabalho se baseia nas análises e avaliações do *B. thuringiensis* como agente de controle biológico na mortalidade das lagartas *S. frugiperda*. Desta forma, quais cepas do *B. thuringiensis* teriam um potencial no controle biológico da *S. frugiperda*? Espera-se que a proteína Cry presente no

microrganismo seja eficaz no controle de lepidópteros, e que a utilização da microbiologia e o controle integrado de pragas sejam eficientes no combate de pragas na lavoura. Esse trabalho se justifica no controle biológico de insetos no qual irá avaliar a mortalidade de lagartas *S. frugiperda* pelo uso da bactéria *B. thuringiensis*, visando à redução de danos agronômicos e perdas de produtividade.

Para o desenvolvimento deste trabalho foi realizada uma pesquisa bibliográfica de natureza descritiva qualitativa, com o principal propósito de auxiliar e aprofundar o estudo. As bases de dados utilizadas para a realização da pesquisa bibliográfica foram Pubmed, Scielo, Scorpion, Portal de periódicos Capes e base de dados da Embrapa, além da busca nos sites da Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB e do Comitê de Nomenclatura de toxinas de *Bacillus thuringiensis*. Foram pesquisados os seguintes termos: *B. thuringiensis*, *S. frugiperda*, controle biológico, controle químico, milho, incidência de pragas, microrganismos entomopatogênicos, agricultura, entre outros. Por decorrência, foi realizada uma pesquisa de campo de natureza descritiva quantitativa, com a aplicação de uma prática em laboratório para observação dos resultados, sendo incorporados aos dados da pesquisa.

Os objetivos do presente estudo foram: selecionar e utilizar cepas de *B. thuringiensis* para o controle da lagarta *S. frugiperda* aplicando a técnica de bioensaio; identificar dentre essas cepas de bactérias aquelas que apresentaram uma alta mortalidade contra a lagarta; caracterizar por meio da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR a cepa que demonstrou alta mortalidade e criopreservar as cepas garantindo a preservação de genes com grande potencial para serem usados contra lagartas no campo e como ferramenta para o controle biológico de pragas.

MATERIAIS E MÉTODOS

SELEÇÃO E ORIGEM DAS CEPAS BACTERIANAS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Controle Biológico - Núcleo NBA da Embrapa Milho e Sorgo - CNPMS, Rod MG 424, Km 45, Zona Rural, localizada na cidade de Sete Lagoas, Minas Gerais. Foram selecionadas vinte e quatro cepas de *Bacillus thuringiensis* com diversas toxicidades para *Spodoptera frugiperda*, pertencentes à Coleção

de Bactérias Entomopatogênicas - CBE do Laboratório de Controle Biológico - Núcleo de Biologia Aplicada - NBA da Embrapa Milho e Sorgo - CNPMS.

As cepas bacterianas (1129E, 258C, 234H, 433A, 234BL, 1129B, 1308B, 1300B1-LM, 375C, 234F, 1009E, 1128, 272B, 1365B-LM, 1399A, BL, 272, 244A, 1197A*, 1386H, 1127E-LM, L356B e 1302B), são procedentes de coletas feitas em várias regiões do Brasil (Minas Gerais, Goiás, Alagoas, Pernambuco e Bahia), em diversos substratos, de acordo com a metodologia descrita no protocolo do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo (2014). Adicionalmente, foi utilizada a cepa HD1 subespécie *Kurstaki*, originária dos Estados Unidos, cedida pela *United States Department of Agriculture - USDA*.

CULTIVO E FERMENTAÇÃO 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 foram pesados separadamente e colocados em um *Becker* contendo aproximadamente 800 mL de água destilada. O material foi levado em um agitador magnético até todos os reagentes serem totalmente diluídos. Após a diluição foi utilizado um pHmetro para acertar o pH do meio a 7,5 utilizando para a correção do mesmo uma base (NaOH 3M). Com o auxílio de um balão volumétrico o volume foi aferido até 1000 mL, de acordo com a metodologia descrita no protocolo do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo (2014).

Uma quantidade de 40 mL do meio de cultura Luria Bertani - LB (líquido) foi distribuída em 24 *erlenmeyers*. Posteriormente cada *erlenmeyer* foi vedado com algodão envolto em tecido e papel alumínio, sendo autoclavado durante 15/20 minutos. Enquanto o material estava sendo autoclavado, a capela de fluxo laminar foi limpa e permaneceu ligada sob luz UV durante 25 minutos. Os *erlenmeyers* contendo o meio de cultura Luria Bertani - LB (líquido) foram levados à capela de fluxo laminar, onde foi realizada a inoculação utilizando-se 100 µL de cada cepa da bactéria de *B. thuringiensis*.

Após essa etapa as amostras inoculadas foram submetidas a um processo de fermentação submersa descontínua (líquida), conduzido em um *shaker* rotativo a 28°C e 200 rpm por 48 horas para crescimento e cultivo da bactéria. Durante o processo de fermentação

não houve acréscimo ou retirada do meio fermentado, os produtos fermentados foram retirados somente após o término do processo. Considerando que no fim da fermentação as proteínas Cry de *B. thuringiensis* são formadas, foi retirada uma alíquota de 10 µL de cada amostra fermentada, e levada ao microscópio óptico para observação da presença de estruturas características da bactéria que ocorrem após a lise celular como as células vegetativas, esporos e cristais. Além disso, foi possível uma análise da cultura que foi fermentada quanto a possíveis alterações que possam ter ocorrido com os fermentados e também quanto às características morfológicas e o potencial entomopatogênico. Após o término do processo as amostras foram armazenadas sob refrigeração até o uso.

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- parahidroxibenzoato (2,1g), formol-formaldeído 36% (2,76 mL), solução inibidora - ácido propiônico 41,8%, ácido fosfórico 4,2% e água 54% (2,76 mL), 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 água destilada até o volume de 433 mL, sendo levado ao microondas por 10 minutos, onde em intervalos foi misturado 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 foram triturados o germe de trigo, a levedura de cerveja, o ácido ascórbico e o nipagin com 466 mL de água destilada durante 5 minutos, sendo posteriormente adicionado a essa mistura o ágar e depois o feijão quente, sendo triturado por mais 5 minutos. A dieta foi vertida em uma forma quadrada, sendo mantida sob luz UV por 20 minutos, de acordo com a metodologia descrita no protocolo do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo (2014).

BIOENSAIOS

Foram utilizados suportes de isopor para colocar os copos plásticos de 50 mL, sendo identificados pelos registros das bactérias. Para cada tipo de isolado bacteriano, foram feitos uma repetição com vinte e quatro copos cada, adicionando-se ($\frac{1}{3}$) da dieta artificial. Uma alíquota de cultura bacteriana (165 μ L) foi depositada na superfície da dieta. Este procedimento também foi realizado para o controle positivo do experimento, somente com água destilada autoclavada isento do patógeno. Após a secagem da cultura bacteriana adicionada à dieta, uma lagarta de segundo ínstar de *S. frugiperda* foi colocada em cada copo, sendo devidamente fechados com tampas de acrílico, ou seja, foram testadas 24 lagartas por repetição, com um total de 600 lagartas testadas, mediante protocolo do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo (2014).

Os bioensaios foram acondicionados na sala de experimentos aclimatizada sob as mesmas condições da sala de criação dos insetos (26 +/- 2°C, 70 +/- 10 de umidade relativa e fotoperíodo de 12 horas). Após sete dias da montagem dos bioensaios, foram feitas as avaliações para constatação da mortalidade das lagartas e também foi analisado cada um dos isolados bacterianos quanto a sua eficiência de controle, com as médias e as porcentagens da mortalidade dos insetos calculadas em cada um dos tratamentos. Como consideração, as cepas de bactérias mais eficientes nos tratamentos foram aquelas que apresentaram um índice de mortalidade de insetos *S. frugiperda* superior a 75%.

CARACTERIZAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DAS CEPAS DE BACTÉRIAS

Todas as cepas inseridas na coleção, inclusive as utilizadas no experimento já foram caracterizadas microscopicamente utilizando um microscópio óptico para a verificação quanto à produção de cristais e molecularmente utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR. Para a cepa que demonstrou mortalidade superior a 75%, foi realizada uma PCR convencional. As reações de amplificação foram preparadas em um volume final de 10 μ L, consistindo de Água Mili Q (4,5 μ L), Tampão 10x (1 μ L), MgCl₂ - 50mM (0,4 μ L), DNTPs - 10mM (0,5 μ L), *primers Forward* (5'CGGGATTAGAGCGTGTATG3') e

Reverse (R5'CATCCAGCGAATCTACCG3') específicos para os genes *cry* (1 µL de cada *primer*), Taq Polimerase - 500U (0,1 µL) e DNA genômico - 10 ng (1,5 µL).

As amplificações foram realizadas em um termociclador com os seguintes programas de temperaturas: desnaturação inicial a 96°C por 1', 30 ciclos de 96°C por 1', 56°C (*primers Cry*), por 1' e 72°C por 1', seguido por uma extensão final de 72°C por 10', mantendo a reação a 4°C. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 2% (m/v), com 8 g de agarose e 400 mL TAE 1x, em tampão TAE - 40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0. A eletroforese foi realizada a 100 V durante 1 hora, com a utilização de uma cuba eletroforética, após essa etapa do processo o gel foi retirado e visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com o auxílio de um fotodocumentador, de acordo com a metodologia descrita no protocolo do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo (2014).

Na etapa de criopreservação das cepas de *Bt*, inicialmente foi realizada a técnica de semeadura por estrias compostas, onde 10 µL de cada inóculo da cultura bacteriana foram transferidos para uma placa de Petri contendo meio de cultura Luria Bertani - LB acrescido de sais e ágar (sólido), fazendo o esgotamento de células por riscas compostas, com o intuito de se obter colônias isoladas. Após 24 horas de crescimento a 28°C foram verificadas as características biológicas da bactéria e a checagem da pureza do acervo.

Posteriormente, uma colônia isolada dessa etapa anterior, foi recolhida e transferida para uma nova placa e espalhada sobre toda a superfície do mesmo meio de cultura Luria Bertani - LB acrescido de sais e ágar (sólido). Após 72 horas de crescimento a 28°C as bactérias foram recolhidas da superfície do meio, solubilizadas em uma solução de crioproteção (glicerol 25%) e armazenadas em criotubos, sendo estocados a -20°C e -80°C, de acordo com a metodologia descrita no protocolo de Procedimento Operacional Padrão - POP TEC da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos - CMMF da Embrapa Milho e Sorgo (2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total das 24 cepas de *B. thuringiensis* testadas e avaliadas, 19 cepas apresentaram uma mortalidade de 4,2% a 25,0%, inclusive o controle positivo do experimento, 4 cepas apresentaram uma mortalidade de 29,0% a 42,0% e a cepa que demonstrou uma maior

mortalidade das lagartas *S. frugiperda* foi a HD1 subespécie *Kurstaki* com 75,0% de controle (Gráfico 1).

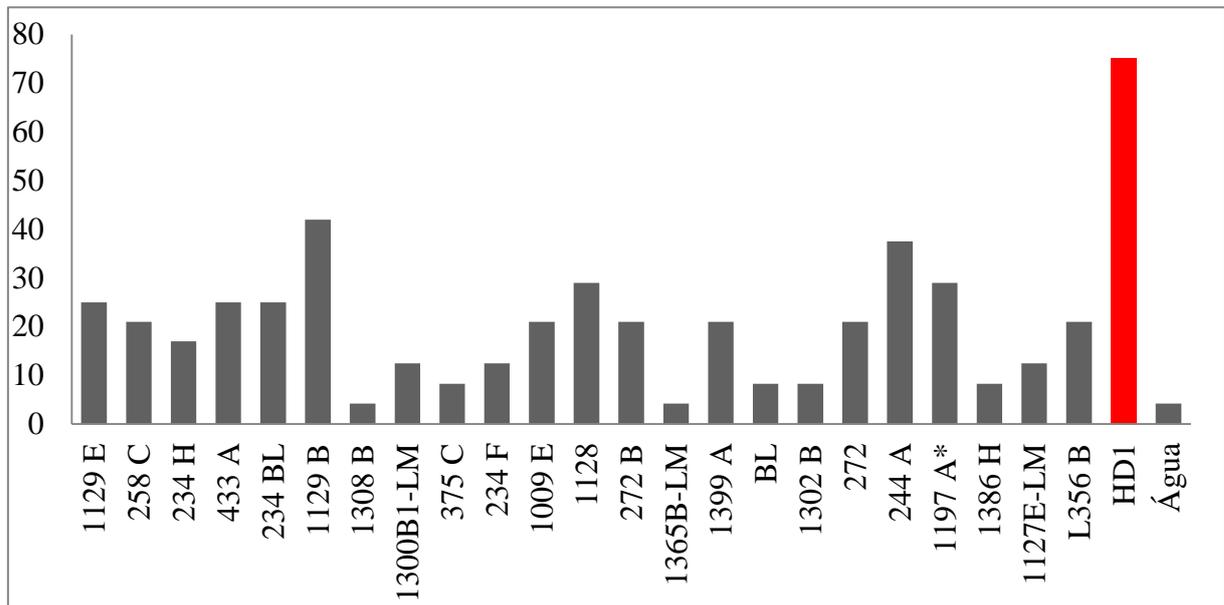


Gráfico 1: Eficiência das cepas de *Bacillus thuringiensis* na mortalidade das lagartas *Spodoptera frugiperda* (%)
HD1: Cepa com a mais alta taxa de mortalidade

Fonte: Dados da pesquisa

A análise dos resultados divergentes da toxicidade dos fermentados e das proteínas Cry presentes nas cepas de bactérias, utilizados nos experimentos, demonstram uma grande importância como forma de avaliar a susceptibilidade dos insetos, o qual se busca o controle como exemplo a *S. frugiperda*, garantindo o sucesso do uso de biopesticida à base de *B. thuringiensis*, para que sejam escolhidas toxinas mais eficientes visando reduzir o número dos insetos nas lavouras e também realizar o manejo correto sobre a resistência.

Os resultados analisados revelam um maior volume e multiplicação da bactéria *B. thuringiensis* no processo de fermentação submersa descontínua (líquida), como as proteínas Cry e genes *cry*, o que pode explicar as variações dos resultados dos bioensaios realizados com as lagartas *S. frugiperda*, pois estes podem ter sido influenciados muitas das vezes pelos parâmetros físicos como a temperatura, o pH e a taxa de oxigênio dissolvido, visto que são importantes no decorrer do processo de fermentação e multiplicação do *Bt*, e devem ser corretamente monitorados para que não alterem a qualidade final de seus produtos, garantindo o sucesso de seu controle (VALICENTE *et al.*, 2015).

Normalmente a temperatura utilizada no cultivo de *B. thuringiensis* é em torno de 28°C e 30°C, não pode ser inferior a 28°C, pois pode provocar uma desaceleração do ciclo de multiplicação celular, elevando o tempo e o custo da produção e não pode ser superior a 30°C, pois, pode provocar uma supressão da formação das proteínas inseticidas Cry o que pode

comprometer a diminuição de seu rendimento e qualidade final do produto. Outro fator muito importante é manter o pH constante indicando as corretas temperaturas ou variações do processo, quando não ocorre esse controle o cultivo pode apresentar redução nos valores ácidos no início do processo de esporulação do microrganismo seguido por valores alcalinos no final do processo, o que não é desejável. A quantidade de oxigênio dissolvido no meio de cultura também é considerado um fator crítico, portanto deve ser bastante analisado e controlado, pois em grandes volumes de fermentação é difícil o suprimento adequado de oxigênio, sendo extremamente responsável pela síntese biológica das proteínas Cry de *B. thuringiensis* (VALICENTE *et al.*, 2015).

A cepa HD1 subespécie *Kurstaki* que demonstrou maior mortalidade dos insetos, superior a 75%, foi analisada morfológicamente quanto à presença das características formadoras da bactéria *B. thuringiensis* como esporos e cristais, e molecularmente, onde foi verificada a presença das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, que são consideradas as constituintes dos cristais sendo codificadas pelos genes *cry1Aa*, *cry1Ab* e *cry1Ac*, altamente tóxicos aos insetos da ordem dos lepidópteros.

No processo de criopreservação espera-se obter uma conservação adequada da bactéria *B. thuringiensis* por longos períodos, de forma organizada, permitindo que as cepas não sofram quaisquer perdas aparentes de viabilidade e também de alterações fenotípicas. E que para preservar uma linhagem de bactéria não devemos somente conservar seu estado inicial evitando possíveis mutações indesejáveis no processo, mas é necessário que se alcance uma melhor preservação das células.

Temos que destacar que os objetivos das etapas do processo de manutenção de uma coleção de microrganismos como as de bactérias, são preservar as suas características e a sua viabilidade, proporcionando uma melhor estabilidade genética do microrganismo por um maior tempo possível, a fim de eliminar grandes mutações que possam vir a alterar essas características. Instituições de pesquisas e empresas especializadas em questões ambientais, como a Embrapa Milho e Sorgo investem nesses estudos, através da realização de técnicas de preservação com protocolos muito bem elaborados e diversas outras tecnologias próprias, o que permite uma disponibilidade do material em qualquer momento.

O Brasil é o quinto maior produtor mundial de produtos derivados da agricultura, destacando-se a cultura do milho *Zea mays* L. Este é um dos produtos mais cultivados, procurados e consumidos pelas populações em grande parte do mundo, sendo utilizado como alimento aos animais através de rações e também para a alimentação humana devido às suas grandes qualidades nutricionais. Portanto é extremamente importante fazer o monitoramento

correto dos insetos nas lavouras para manter um ótimo equilíbrio do sistema agrícola e não ocorrer grandes perdas econômicas que possam vir a diminuir o rendimento das produções. Os estudos com o controle biológico apresentam como intuito o combate das lagartas que se tornaram pragas em culturas agrícolas de importância econômica. Como exemplo podemos citar a lagarta *S. frugiperda*, espécie que mais preocupa os grandes produtores de milho no Brasil.

Os produtos químicos possuem efeitos rápidos no controle de pragas de uma determinada população, ou seja, tem uma ação sobre todos os organismos vivos presentes na lavoura. Os produtos biológicos se diferem, pois possuem efeitos lentos, agindo apenas sobre a praga que está atacando a lavoura. É necessário o investimento na transferência de conhecimentos aos agricultores sobre os efeitos dos agrotóxicos nas lavouras, pensando qual seria a importância da introdução dos produtos biológicos para controlar os insetos pragas na agricultura, que são muito benéficas. É um método que possibilita o entendimento sobre os venenos que são provenientes da utilização de produtos químicos de controle estarem presentes nos alimentos, na água e no solo, e com o passar do tempo se acumulam no organismo, provocando ou causando alguma doença. Colocar um defensivo biológico no mercado é um processo lento o que ocasiona a um gasto de tempo, pois passa por legislações, por testes e nos custos altos para liberação de patentes.

Um dos obstáculos para tornar o defensivo químico menos utilizado nas lavouras é ganhar a confiança dos agricultores, isso porque já estão muito acostumados a utilizarem esses tipos de produtos, pois para eles os agrotóxicos representam lucro e já conhecem o seu espectro de ação nas lavouras. Enquanto que nos produtos biológicos são necessários que se forneçam informações aos agricultores para que possam conhecer e saber da necessidade em se usar esses produtos, isso porque o controle é feito por microrganismos muito pequenos como as bactérias, fungos ou protozoários e se o agricultor não conhecer dificilmente ele acreditará no seu verdadeiro poder de ação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS, IMPLICAÇÕES DA PESQUISA, LIMITAÇÕES DA PESQUISA E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com o estudo realizado pôde-se inferir que a maioria das cepas de *B. thuringiensis* não apresentaram efeitos positivos sobre a mortalidade das lagartas *S. frugiperda*, e que

apenas uma apresentou uma alta mortalidade sobre esses insetos, indicando que devem ser feitos mais testes e que o uso da bactéria deve ser mais estudado e analisado para ser usado como um instrumento efetivo no controle biológico dos insetos. Os inseticidas biológicos à base de *B. thuringiensis* representam uma fonte importante de genes e de outras substâncias benéficas, por isso é necessário estar sempre investindo nessas pesquisas devido as suas ótimas vantagens.

Os resultados do trabalho confirmam que a preservação da bactéria *B. thuringiensis* deve garantir o sucesso da viabilidade e ser isento de contaminações. Se mantermos essas características e fizermos uma preservação adequada da bactéria será de grande interesse para instituições de pesquisa, para o agronegócio e também para o meio ambiente, pois é uma área que demanda cada vez mais pesquisas.

Para garantir a preservação em longo prazo do acervo, possibilitando a utilização futura no desenvolvimento de novos biopesticidas, é importante que coleções de pesquisas que envolvam estudos com a bactéria *B. thuringiensis*, citando a CBE que é pertencente ao Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo representem uma fonte importante de genes e outras substâncias com grande potencial biotecnológico, podendo auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias, visando uma maior eficiência biotecnológica da bactéria *B. thuringiensis* no controle de insetos.

O estudo realizado apresentou algumas implicações, indicando que mais estudos são necessários durante todas as etapas do processo sendo importante a atenção nas análises da cultura de *B. thuringiensis* como observar os parâmetros físicos quanto a temperatura, pH e os processos de agitação e aeração, e os parâmetros biológicos a fim de evitar possíveis contaminações ou indesejáveis mudanças na reação do comportamento da bactéria o que pode implicar na interação entomopatogênica com a lagarta *S. frugiperda*.

O estudo realizado apresentou várias limitações importantes quanto ao financiamento do projeto da Embrapa, sobre a disponibilidade dos reagentes, os equipamentos, as vidrarias, a bactéria *B. thuringiensis* e as lagartas *S. frugiperda*, para a realização do trabalho. Outro fator limitante ao crescimento do mercado e de empresas especializadas é que o prazo de validade dos produtos biológicos é medido em meses ou até em semanas, enquanto o dos produtos químicos é medido em anos, sendo considerada uma grande limitação, visto que poderia ser feito avaliações mais precisas, permitindo uma maior ampliação do tempo de prateleira melhorando a qualidade desses produtos.

O trabalho fornece dados que serão relevantes para posteriores trabalhos visando uma elaboração de estratégias como a utilização de bioensaios, sugerindo que as cepas de *B.*

thuringiensis devem ser cuidadosamente selecionadas para controlar os insetos ou até mesmo realizar novos testes para confirmar os resultados obtidos. Outros trabalhos interessantes seriam aqueles que avaliassem a bactéria *B. thuringiensis* como controle biológico para outras espécies de lagartas como *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania*, *Helicoverpa zea*, *Helicoverpa armigera*, *Diatraea saccharalis*, *Chrysodeixis includens*, *Diabrotica speciosa*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Alabama argilacea*, *Heliothis virescens* e *Anticarsia gemmatalis*, tanto em laboratório como em testes que fossem realizados na cultura do milho e de outras plantas como a soja e o algodão, isso faria com que suas ações fossem mais estudadas e mais conhecidas.

E é extremamente importante estar atento aos diversos estudos que visam um excelente cultivo de fermentação com o uso de *B. thuringiensis*, analisando os parâmetros biológicos como as características morfológicas e possíveis contaminações, e também analisando os parâmetros físicos como a temperatura, pH e taxa de oxigênio dissolvido, o que leva a um melhor controle da atividade tóxica das proteínas Cry e genes *cry*, sendo altamente eficientes e garantindo sucesso ao controle biológico de todos os insetos citados anteriormente e em suas respectivas culturas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMPANINI, Emeline B. *et al.* **Caracterização de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de importantes insetos-praga da agricultura.** *Bragantia*, Campinas, v.71, n.3, p. 362-369, 2012.

CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento.** *Site.* Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 18 de maio de 2016.

CONSTANSKI, Kelly C. *et al.* **Seleção e caracterização molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Spodoptera spp.*** *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.50, n.8, p.730-733, ago. 2015.

COSTA, Leidiane E. C. da; QUEIROZ, Érica S. M. **Plantas geneticamente modificadas com toxinas de *Bacillus thuringiensis*: uma ferramenta para conferir resistência contra insetos praga.** *Universitas Ciências da Saúde*, Brasília, v.12, n.2, p.99-106, jul/dez 2014.

CRICKMORE, Dr. Neil *et al.* ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature.** *Site.* Disponível em: <www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore>. Acesso em: 19 de maio de 2016.

FINKLER, Christine L. L. **Controle de insetos: Uma Breve Revisão**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, vs.8 e 9, n.4, p. 169-189, 2011/2012.

GALZER, Elisângela Carolina W; AZEVEDO FILHO, Wilson Sampaio. **Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas**. Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada, v. 1, n. 1, p. 13-16, 2016.

GATTI, J. H. *et al.* **Eficiência de diferentes tecnologias *Bt* no controle de pragas na safrinha: I. Controle da lagarta-do-cartucho**. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 29. Águas de Lindóia. Anais Águas de Lindóia: ABMS, p. 973-978, 2012.

LIMA JR, I.S. *et al.* **Infestação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e seus inimigos naturais em milho nas condições de sequeiro e irrigado**. Revista Agrarian, v.5, p. 14-19, 2012.

MELO, Elmo P. de *et al.* **Disposição espacial e injúrias da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho**. Rev. Ceres, Viçosa, v.61, n.3, p. 343-349, mai/jun, 2014.

PESSOA, Alciani da S. *et al.* ***Bacillus thuringiensis* Berliner e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae) sob ação de extratos vegetais**. Arq. Inst. Biol, v.81, n.4, p. 329-334, out. 2014.

PETERLINI, Edicarlos *et al.* **Desenvolvimento da lagarta-do-cartucho em híbridos de milho com diferentes tecnologias *Bt***. Revista Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias, v.9, n.2, p. 58-65, dez. 2014.

Procedimento Operacional Padrão Cód. POP TEC Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos - CMMF 01. Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo CNPMS, Sete Lagoas/MG, p. 1-12, set. 2014.

Protocolo com o preparo da dieta dos insetos e principais técnicas moleculares. Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo CNPMS, Sete Lagoas/MG, p. 1-5, 2014.

SANTOS, Letícia Machado dos *et al.* **Fertility and longevity of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in corn genotypes**. Ciência Rural, v. 34, n. 2, p. 345-350, 2004.

VALICENTE, Fernando H. **Manejo Integrado de Pragas na Cultura do Milho**. Circular técnica, v.1679-1150, n.8, p. 1-13, jun. 2015.

VALICENTE, Fernando H. *et al.* **O produtor pergunta, a Embrapa responde.** Revista científica v.12, n.5, p. 1-332, 2015.