

PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE *Bacillus thuringiensis* Berliner PARA *Anticarsia gemmatalis* Hübner

Carolina de Oliveira Bernardes¹, co-autor², Ricardo Antonio Polanczyk¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Produção Vegetal, Alto Universitário, s/nº - Cx Postal 16, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, carolina.bernard@hotmail.com.

²Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/Entomologia Agrícola, Via de Acesso Prof. Paulo Castellane s/n 18444-900 - Jaboticabal, SP – Brasil, rapolanc@yahoo.com.br.

Resumo- Os insetos-praga são uns dos fatores que limitam a produção e a expansão da soja no Brasil. Entre eles, destaca-se *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). A utilização de agentes de controle biológico é uma alternativa para reduzir o impacto ocasionado pela adoção do uso intensivo de produtos químicos nas lavouras. Dentre os principais agentes de controle biológico, destaca-se a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*. Dessa forma, este trabalho avalia isolados de *B. thuringiensis*, obtidos do banco de entomopatógenos do laboratório NUDEMAFI e a formulação comercial Dipel®, visando sua utilização em programas de manejo de *A. gemmatalis* e analisa a suscetibilidade e a toxicidade desses isolados através de estimativas da CL₅₀ dos isolados. Foram utilizados vinte e três isolados de Bt. Dentre eles, cinco isolados 80, 997, 716, 633 e 1054, além do Dipel®, ocasionaram mortalidade superior a 90%, os demais isolados proporcionaram mortalidade inferior a 78%. A CL₅₀ para lagartas de *A. gemmatalis* variou conforme o isolado utilizado de 8×10^7 a $1,9 \times 10^8$; portanto, não foi possível selecionar um isolado mais virulento, uma vez que estatisticamente houve a sobreposição dos intervalos de confiança.

Palavras-chave: Controle biológico, bactéria entomopatogênica, Soja.

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias (Agronomia)

Introdução

Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), é uma das principais pragas desfolhadoras da cultura da soja (PANIZZI & CORRÊA-FERREIRA, 1997). Altas infestações desse inseto em lavouras de soja podem comprometer a produção em função do nível de infestação e do estágio fenológico da cultura (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000). O uso dos inseticidas químicos, além de ser prejudicial ao meio ambiente e ao homem, é de alto custo para o agricultor. Além disso, o uso contínuo dos mesmos ingredientes ativos resulta no surgimento de populações de *A. gemmatalis* resistentes, o que tem levado à continuidade de trabalhos com objetivo de testar novos produtos e/ou formulações, visando o controle destas pragas (BONADIMAN, 2008).

O controle biológico de pragas, que utiliza microrganismos é uma alternativa ao uso de inseticidas químicos. Na busca de novas alternativas, os entomopatógenos possuem excelente potencial para serem empregados como método de controle que tem o objetivo de minimizar o impacto das pragas sobre a produção agrícola. (POLANCZYK et al., 2005). A bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae) (Bt), destaca-se no cenário mundial desde 1938, quando o primeiro

produto formulado com esse patógeno foi lançado na França (POLANCZYK, 2004). O modo de ação desse microrganismo está relacionado à solubilização das proteínas Cry no intestino dos insetos suscetíveis. Esse processo resulta na liberação de fragmentos tóxicos, que se ligam a receptores específicos na membrana do epitélio intestinal, levando à formação de poros e ao desequilíbrio osmótico da célula. O inseto morre por inanição ou por septicemia (FIUZA, 2004).

Além da patogenicidade e virulência desse patógeno contra insetos-praga, outros aspectos como os efeitos subletais sobre os indivíduos sobreviventes, embora difíceis de detectar, certamente ocorrem e representam um importante parâmetro, que auxilia na avaliação de sua atividade tóxica (POLANCZYK, 2004). Essa bactéria entomopatogênica pode ser considerada como o agente biológico de maior potencial para o controle de insetos-praga florestais, agrícolas e vetores de doenças, devido à especificidade das δ -endotoxinas aos insetos e invertebrados alvo, fazendo deste agente um componente chave em estratégias de manejo integrado de pragas e controle de vetores de doenças (SCHNEPF et al., 1998).

Dessa forma, este trabalho seleciona isolados de Bt com elevada atividade tóxica contra *A. gemmatalis*, para utilização em programas de manejo integrado do inseto na cultura da soja.

Metodologia

Os testes de patogenicidade, a estimativa da CL_{50} e a criação de *A. gemmatalis* foram realizados no Laboratório de Entomologia do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI), do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES) em Alegre, Espírito Santo.

Criação do hospedeiro. As lagartas foram obtidas da criação estoque no NUDEMAFI. Ovos de *A. gemmatalis* foram acondicionados em potes plásticos de 1,1 L com a tampa furada e vedada com tecido organza para aumentar a aeração. As lagartas foram alimentadas com dieta artificial constituída por 125g de feijão, 62,4g de levedo de cerveja, 100g de gérmen de trigo, 100g de proteína de soja, 50g de caseína, 35g de ágar, 5g de nipagin, 6g de ácido ascórbico, 3g de ácido sórbico, 6 mL de formol a 40% e 10 ml de solução vitamínica (niacinamida, pantotenato de cálcio, tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido fólico, biotina e vitamina B₁₂) (GREENE et al., 1976).

Adultos foram criados em gaiolas de madeira (40 x 40 x 40 cm) com as laterais teladas e com tampa de vidro em salas climatizadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 12h. Esses adultos foram alimentados com dois chumaços de algodão contidos em duas placas de Petri (15 x 1,5 cm), embebidos em solução nutritiva (mel 10,5 g, água destilada 1,05 L, cerveja 350 ml, sacarose 60 g, nipagin 1,05 g, ácido ascórbico 1,05 g), localizados no interior da gaiola (GREENE et al., 1976). As posturas foram coletadas em folhas de papel branco no interior das gaiolas, as quais foram recortadas e colocadas nos potes de criação com a dieta artificial.

Obtenção dos isolados. Foram utilizados vinte e três isolados de *B. thuringiensis* escolhidos ao acaso, no banco de entomopatógenos do NUDEMAFI, e a formulação comercial Dipel® (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*). Os isolados desta coleção foram estocados na forma de fitas de papel filtro, impregnados com uma suspensão de esporos, mantidos a 4°C . Os isolados de Bt utilizados foram coletados em solos de diferentes locais do Brasil (Tabela 1).

Os isolados foram multiplicados em meio de cultura BHI ("Brain Heart Infusion" ou Infusão de Cérebro e Coração - Biobrás) a 28°C , sob agitação orbital a 180 rpm por 72 h, para um crescimento padrão dos mesmos. Após a lise bacteriana, a mistura contendo esporos, cristais e células vegetativas foram transferidas para tubos de Falcon, com 5 mL de água destilada e esterilizada, e foram submetidas a 3 centrifugações consecutivas de 5.000 rpm por 20 min. Após a última centrifugação, o material foi

resuspenso em água destilada esterilizada e utilizado no experimento. Em seguida, uma alíquota de 1 mL da suspensão foi diluída 100 vezes em água destilada, e a concentração de esporos determinada por meio de leitura em câmara de Neubauer, conforme método descrito em Alves & Moraes (1998). O *B. thuringiensis* var. *kurstaki* foi obtido de formulação comercial e utilizado conforme recomendações do fabricante.

Tabela 1 – Isolados de *Bacillus thuringiensis* e seus respectivos locais de coleta

Isolados de Bt	Local de Coleta
R251	-
R239	-
937H2	Uberaba - MG
101	-
287	-
814B	Ervália - MG
105	-
SP13	-
R238	-
1005	Uberaba - MG
879C	-
1034F	Sacramento - MG
1054	Coqueiral - MG
633	Ervália - MG
997	Uberaba - MG
716	Indefinido
80	-
8326H	-
858H	Patos de Minas - MG
277L	-
100	-
SP5	-
5244	-

Testes de patogenicidade. Os bioensaios foram realizados, espalhando-se 150 μl da suspensão de Bt contendo 3×10^8 esporos/mL de cada um dos 23 isolados em potes descartáveis, contendo dieta artificial previamente distribuída. Após a absorção e evaporação do excesso de água, 10 lagartas de primeiro instar de *A. gemmatalis*, foram acondicionadas nos potes descartáveis que continham a dieta, com 10 repetições. Para o controle foi aplicado água destilada e esterilizada na superfície da dieta.

Os bioensaios foram mantidos em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de UR e 14 h de fotofase, sendo avaliada a mortalidade diariamente, durante sete dias. O critério de mortalidade usado para as lagartas foi o de estar imóvel e escurecida ou que não conseguisse se locomover a uma distância igual a do seu corpo. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado. Os dados de mortalidade foram

submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando o programa SAEG 5.0. A mortalidade corrigida foi calculada pela fórmula de Abbott (1925).

Testes para estimativa da CL_{50} . Biosensaio para estimar os valores de CL_{50} foram realizados apenas com os isolados de Bt, que causaram mortalidade acima de 90% nos testes de patogenicidade. Esses ensaios foram conduzidos com a mesma metodologia e condições descritas acima. A amplitude das concentrações testadas foi pré-estabelecida em ensaio preliminar em valores que atendessem às exigências da análise de Probit (5 a 95% de mortalidade). Para cada isolado, foram testadas seis concentrações espaçadas logaritmicamente 1×10^7 , $6,8 \times 10^7$, $1,26 \times 10^8$, $1,84 \times 10^8$, $2,4^2 \times 10^8$ e 3×10^8 esporos/mL e controle (água destilada e autoclavada). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 10 lagartas, distribuídas em 10 repetições para cada concentração. Os bioensaios de estimativa da CL_{50} foram avaliados a cada 24 h, até o sétimo dia após a aplicação. A concentração letal (CL_{50}) foi calculada pela análise de Probit, utilizando o programa Polo-PC (LEORA SOFTWARE, 1987).

Resultados

Bioensaios de patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* em *Anticarsia gemmatalis*. A patogenicidade dos isolados de *B. thuringiensis* e o produto comercial Dipel apresentaram resultados significativos, em que os isolados 716, 633, 80, 1054, 997 e o Dipel proporcionaram mortalidade superior a 90%. Os demais isolados apresentaram percentuais abaixo de 78%, não sendo promissores para o controle de *A. gemmatalis* (Tabela 2).

Tabela 2 – Mortalidade corrigida (%) (\pm EP) de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) inoculadas em dieta artificial, contendo suspensão de diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*, a $25 \pm 1,0$ °C, U.R. $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14h

Isolado	Mortalidade
Dipel	97,94 \pm 2,1 a
716	95,88 \pm 2,7 a
633	95,88 \pm 3,1 a
80	95,88 \pm 4,1 a
1054	93,88 \pm 6,1 a
997	92,80 \pm 3,5 a
466	77,56 \pm 2,0 b
676	77,34 \pm 2,1 b
537	74,75 \pm 2,7 b
1028	68,38 \pm 3,2 b
984	61,24 \pm 5,2 c
238	57,77 \pm 2,8 c
273	57,76 \pm 4,2 c
167	54,67 \pm 2,8 c
725	49,00 \pm 3,4 d
101	48,00 \pm 4,4 d
100	47,44 \pm 3,9 d
478	46,00 \pm 3,4 d
816	45,00 \pm 3,4 d
287	44,00 \pm 3,1 d
467	41,00 \pm 3,1 d
531	12,66 \pm 2,6 e
105	4,85 \pm 3,3 e
637	1,92 \pm 1,9 e
Testemunha	0,00 \pm 0,0 e

Médias seguidas pela mesma letra não diferenciam significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Estimativa da Concentração Letal Média (CL_{50}).

A concentração letal requerida para ocasionar a mortalidade de 50% da população de *A. gemmatalis* variou de $8,1 \times 10^7$ a $1,9 \times 10^8$ esporos/mL de *B. thuringiensis*. Com relação ao Dipel, a concentração de $8,0 \times 10^7$ esporos/mL foi necessária para ocasionar a morte de 50% das lagartas de *A. gemmatalis*. De acordo com o intervalo de confiança, houve resposta semelhante entre os isolados 80, 633, 997, 1054 e o Dipel. O isolado 716 diferiu dos isolados 633 e 80, sendo que não houve diferença entre este e os isolados 997, 1054 e Dipel; portanto, não foi possível selecionar um isolado mais virulento dentro do grupo (Tabela 3).

Tabela 3 - Dados de inclinação das curvas de concentração-mortalidade, concentração letal (CL₅₀), número de graus de liberdade (GL) e teste qui-quadrado (χ^2) dos isolados de *B. thuringiensis* em lagartas de *A. gemmatalis*

Isolado	n ¹	Inclinação ± EPM ²	CL ₅₀ (esporos/ml) (IC95%) ³	GL	χ^2
80	500	1,53 ± 0,165	8,1 x 10 ⁷ (4,9 x 10 ⁷ - 1,2 x 10 ⁸)	3	4,5 2
633	500	1,41 ± 0,161	9,4 x 10 ⁷ (7,5 x 10 ⁷ - 1,1 x 10 ⁸)	3	2,8 7
716	400	0,863 ± 0,157	1,9 x 10 ⁸ (1,3 x 10 ⁸ - 3,6 x 10 ⁸)	2	0,6 4
997	500	3,35 ± 0,303	1,2 x 10 ⁸ (1,0 x 10 ⁸ - 1,3 x 10 ⁸)	3	2,6 4
1054	500	1,03 ± 0,140	1,2 x 10 ⁸ (9,3 x 10 ⁷ - 1,7 x 10 ⁸)	3	0,6 4
Dipel	400	1,76 ± 0,198	8,0 x 10 ⁷ (2,3 x 10 ⁷ - 1,5 x 10 ⁸)	2	3,7 3

¹n: Número de insetos usados no teste; ²EPM: Erro-padrão da média; ³IC95%: Intervalo de confiança das CL₅₀ a 95% de probabilidade.

Discussão

Bioensaios de patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* em *Anticarsia gemmatalis*. Resultados de superioridade ou semelhança de estirpes contra lepidópteros com o padrão Dipel, já haviam sido relatados por Souza et al. (1999).

Barreto (2005) mostrou que entre 341 isolados da bactéria avaliados em *A. gemmatalis*, apenas 10 mostraram ação entomocida para esta. Em outro estudo, entre nove isolados testados contra lagartas de *A. gemmatalis*, quatro apresentaram mortalidade igual ou superior que o padrão Dipel (BOBROWSKI, 2001). De 41 isolados de Bt, 44% dos isolados produziram taxa de mortalidade em *A. gemmatalis* maior que 70% (BERÓN, 2006). Da Silva et. al (2004) mostraram que três isolados testados causaram mortalidade de 100% em lagartas de *A. gemmatalis*.

Os resultados obtidos nos testes de patogenicidade salientam a necessidade de realizações dos mesmos, para que se possa determinar os isolados que sejam eficientes no controle do inseto em questão. A variação na eficiência dos isolados testados neste estudo, pode ser explicada por uma série de fatores,

relacionados ou não, ligados ao modo de ação desse patógeno, como: dissolução do cristal, ativação da protoxina e ligação da toxina ativada a receptores no epitélio intestinal, sendo que, este último mostra uma maior complexidade funcional e é, geralmente, determinante no desenvolvimento da doença no inseto-alvo (PEYRONNET et al., 1997).

Com relação à especificidade, algumas toxinas de Bt podem ligar-se ao(s) receptor(es) sem, no entanto, esta ligação ser suficiente para causar a morte do inseto (POLANCZYK, 2004). Embora a afinidade pelos receptores seja o principal fator que determine o nível de suscetibilidade de uma espécie para as toxinas Cry, foi observado que para *Heliothis virescens* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) a ativação da protoxina pelas proteases é o principal fator determinante para eficiência do patógeno. As enzimas digestivas da população de insetos resistentes são capazes de degradar as toxinas de tal modo que diminui significativamente a quantidade de toxina ativa no lúmen do intestino médio, em um determinado momento, reduzindo a toxicidade (FORCADA et al., 1996).

Estimativa da Concentração Letal Média (CL₅₀). Silva et al. (2004) estimaram a CL₅₀ de três isolados de Bt (S701, S764, S1265) e do formulado Dipel® para lagartas de *A. gemmatalis* e encontraram que o isolado mais efetivo (S1265) apresentou CL₅₀ de 4,08 x 10⁵ esporos/mL, enquanto foi necessário 1,8 x 10⁶ esporos/ml de Dipel®, para ocasionar a mortalidade 50% da população de *A. gemmatalis*.

A mortalidade dos insetos variou conforme isolado e concentração utilizada, o que sugere a realização de estudos para que se determine doses diferenciadas do isolado para o controle da praga. Ignoffo et al. (1977) constataram que lagartas de *A. gemmatalis* foram 12 vezes mais suscetíveis à bactéria em relação às lagartas de *Pseudoplusia includens* Walker (Lepidoptera:Noctuidae). A diferença de suscetibilidade tem sido constatada em diversos trabalhos (ABBAS ALI & YOUNG, 1993).

Conclusão

Entre vinte e três isolados testados, cinco (80, 633, 716, 997, 1054) causaram mortalidade superior a 90% em *A. gemmatalis*, não sendo diferentes quanto à virulência.

Referências

- ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B.

(Ed.). **Controle microbiano de insetos.** Piracicaba: FEALQ, p. 765-777. 1998.

- ABBAS ALI & S.Y. YOUNG. *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* activity against larvae of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton. **Journal of Economic Entomology**, 86: 1064 – 1068. 1993.

- ABBOT, W.S. A method for computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Invertebrate Pathology**, 18: 265-267. 1925.

- BARRETO, M.R. **Prospecção e caracterização de Genes de *Bacillus thuringiensis* com potencial para o controle de insetos-praga da cultura da soja.** 2005. Tese (doutorado em Biologia). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 14. 2005.

- BERÓN, C.M.; SALERNO, G.L. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina that are potentially useful in insect pest control. **BioControl**, 2006.

- BONADIMAN R., **Pontas de pulverização e volumes de calda no controle de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 e *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) na cultura da soja *Glycine max*.** 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), 2008.

- BOBROWSKI, V.A.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H.; FIUZA, L.M. Detection of *Cry1* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from south of Brazil and activity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, 32:105-109, 2001.

- DA SILVA, S.M.B.; SILVA-WERNECK, J.O.; FALCÃO, R.; GOMES, A.C.; FRAGOSO, R.R.; QUEZADO, M.T.; NETO, O.B.O.; AGUIAR, J.B.; DE SÁ, M.F.G.; BRAVO, A.; MONNERAT, R.G. Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. **Journal of Applied Entomology**, 128, 102–107, 2004.

- FIUZA, L.M. Receptores de *Bacillus thuringiensis* em insetos. **Biociência e Desenvolvimento** 32: 84-89. 2004.

- FORCADA, C.; ALCÁCER, E.; GARCERÁ, M.D. Differences in the midgut proteolytic activity on two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins.

Archives on Insect Biochemistry and Physiology, v.32, n.2, p.257-272, 1996.

- GREENE, G.L.; LEPPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v.69, p.487-488, 1976.

- HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; OLIVEIRA, L.J.; SOSA-GOMEZ, D.R.; PANIZZI, A.R.; CORSO, I.C.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado.** Londrina: Embrapa Soja. 70p. (Circular Técnica/EMBRAPA Soja, n. 30). 2000.

- IGNOFFO, C.M.; D.L. HOSTETTER; R.E. PINNELL & C. GARCIA. Relative susceptibility of six soybean caterpillars to a standard preparation of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*. **Journal of Economic Entomology**, 70: 60 – 63. 1977.

- LEORA SOFTWARE. POLO-PC: An user`s guide to Probit or Logit analysis. **LeOra Software**, Berkely, 1987.

- PANIZZI, A.R. & B.S. CORRÊA-FERREIRA. Dynamics in the insect fauna adaptation to soybean in the tropics. **Trends in Entomology**, 1: 71-88. 1997

- PEYRONNET, O.; VACHON, V.; BROUSSEAU, R. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. **Applied and Environmental Microbiology**, Massachusetts, v. 63, n. 5, p. 1679-1684, 1997.

- POLANCZYK, R.A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith).** 2004. Tese (Doutorado em Entomologia) – Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

- POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. B. Interação entre *Bacillus thuringiensis* e outros entomopatógenos no controle de *Spodoptera frugiperda*. **Manejo Integrado de Pragas y Agroecologia**, Turrialba, v. 74, p. 24-33, 2005.

- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R. AND DEAN D. H.; *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 775–806. 1998.

XVINIC

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica

XI EPG

Encontro Latino Americano
de Pós Graduação

VINIC Jr

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica Júnior

- SOUZA, M.T. de; LIMA, M.I.; SILVA-WERNECK, J.O.; DIAS, J.C.S.; RIBEIRO, B.M. Ultrastructural and molecular characterization of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S93 active against *Spodoptera frugiperda*. **Biocell**, v.23, p.43-49, 1999.