



FERNANDO H. Valicente e RODRIGO F. Zanasi.

Embrapa Milho e Sorgo. Caixa Postal 151,
Sete Lagoas, MG 35 701 – 970

valicent@cnpms.embrapa.br

INTRODUÇÃO:

Bacillus thuringiensis (*Bt*) é uma bactéria gram positiva, encontrada no solo, água e insetos mortos, que durante o processo de esporulação produz um cristal protéico que é tóxico para insetos. As proteínas (δ endotoxinas) que formam estes cristais somam entre 20 a 30% da proteína total da bactéria na fase de esporulação. Os genes *cry* codificam para a formação destas proteínas de ação inseticida). As atividades das δ endotoxinas é restrita ao trato digestivo dos insetos. O consumo de alimento tratado com endotoxinas geralmente resulta na parada da alimentação de larvas de lepidópteros e, a paralisação do intestino que retarda a passagem de material vegetal ingerido e permite que os esporos germinem e passem a crescer vegetativamente. Quando as larvas se alimentam com altas doses da toxina sofrem uma paralisia geral seguida de morte. Estudos têm demonstrado que as toxinas liberadas e proteoliticamente ativadas no intestino se ligam a sítios de receptores específicos nas membranas das células colunares do intestino médio, formando poros que interferem com o sistema de transporte de íons da célula. Com altas doses da toxina, isto causa a lise do epitélio do intestino médio, resultando numa morte rápida. Com doses mais baixas ou em insetos menos susceptíveis, dano às células intestinais é suficiente para parar a secreção normal do intestino, o qual abaixa o pH do lúmen e permite os esporos germinarem.

A lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, é uma das principais pragas da cultura do milho no Brasil. O ataque deste inseto pode reduzir a produção de grãos em até 34%, sendo o controle feito essencialmente com inseticidas químicos. O ciclo de vida deste inseto é completado em 30 dias em condições de laboratório e, o número de ovos pode variar de 100 a 200 por postura/fêmea, sendo que um total de 1500 a 2000 ovos pode ser colocado por uma única fêmea. Assim, percebe-se o potencial de dano que este inseto pode causar no campo. O *Bt* pode se tornar uma alternativa viável e econômica para controle desta praga, evitando a contaminação do meio ambiente, de aplicadores e morte de inimigos naturais.

Esta bactéria pode ser cultivada em meio sólido, líquido e semi-sólido. O uso de produtos ou subprodutos (água de milho, vinhaça, arroz, água de beterraba, fubá, farinha e/ou farelo de soja) para produção deste patógeno é uma alternativa viável e econômica. Este trabalho teve como objetivo testar produtos alternativos na forma líquida e sólida como meio alternativo de cultivo de *Bt*.

MATERIAL E MÉTODOS:

Foram realizados bioensaios com meios alternativos líquidos e sólidos para o cultivo do *Bt*. No primeiro bioensaio, foi usada a cepa 344 (*Bacillus thuringiensis tolworthi*) do Banco de Microorganismos da Embrapa Milho e Sorgo. Para cada litro de água foram adicionados 5g de farinha de soja e 15g de glucose de milho. Os tratamentos utilizados neste experimento foram: T1- o meio foi fervido e com agitação constante, T2- meio fervido e sem agitação, T3- meio não fervido e com agitação constante, T4- meio não fervido e sem agitação e T5- testemunha – água mais *Bt* com agitação. Para os tratamentos 1 e 2, o meio foi fervido em uma chapa aquecedora por 2 minutos e depois deixado em temperatura ambiente. Quando o meio atingiu a temperatura de aproximadamente 30°C, este foi inoculado com o *Bt* (cepa 344) previamente crescido em meio líquido e estéril, agitado por 4 dias a 30°C. Para os tratamentos 3 e 4 o material foi inoculado em temperatura ambiente e, somente o tratamento 3 foi agitado. A agitação para todos os tratamentos foi de 180rpm. As lagartas sadias, provenientes da criação artificial, utilizadas nos bioensaios tinham dois dias de idade e, para cada tratamento foram usadas as concentrações de 10⁶, 10⁷ e 10⁸ esporos/ml, sendo o material colocado sobre a dieta artificial e fornecido aos insetos. A mortalidade foi avaliada diariamente. No segundo bioensaio foi usado arroz autoclavado (esterilizado) e as cepas T09 e 344 (*Bacillus thuringiensis tolworthi*) e a cepa 1644 (coletada em amostra de solo mas ainda não identificada). Foram usados 50 e 100 gramas de arroz autoclavado e inoculados com 20 mL e 40 mL da bactéria em forma líquido e estéril contendo as cepas de *Bt*. Depois de 5 dias a 30°C em estufa, o arroz foi lavado 3 vezes com água, sendo o líquido resultante diluído para contagem de esporos. Larvas sadias de 2 dias de idade foram usadas para os bioensaios, sendo mantidas em recipientes plásticos de capacidade de 50mL. A avaliação de mortalidade foi feita diariamente.

No terceiro bioensaio foram usados 50 e 100 gramas de arroz mais glucose de milho e farelo de soja. Depois da mistura ter sido esterilizada, foi inoculada com 20mL(para 50 gramas) e 40 mL (para 100 gramas) de um fermentado líquido contendo a cepa T09. O arroz inoculado foi mantido a 30°C por 5 dias em estufa. As lagartas testadas tinham 2 dias de idade e eram provenientes da criação artificial. A mortalidade foi avaliada diariamente.

Um quarto bioensaio foi realizado usando 50 e 100 gramas de arroz esterilizado, usando somente 20 mL de inóculo da cepa T09, 344 e 1644. As cepas de *Bt* foram crescidas previamente em meio líquido por 4 dias a 30°C. Este material foi usado na inoculação de arroz esterilizado e deixado a 30°C por 5 dias. Após este período, o material foi lavado com água por 3 vezes e o líquido resultante, foi diluído para obtenção de uma série de concentrações que foram utilizadas no teste de mortalidade contra a lagarta do cartucho. O meio de cultura padrão usado foi o meio LB mais sais (MgSO₄, FeSO₄, ZnSO₄ e MnSO₄).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O primeiro bioensaio foi repetido duas vezes e mostrou que a maior mortalidade foi causada pelo material fervido e agitado constantemente, na concentração de 10^8 esporos/ml (100% de mortalidade) para o primeiro bioensaio e mortalidade de 100% na concentração de 10^9 esporos/mL. A produção de esporos máxima variou de 4×10^8 esporos/mL a 1.5×10^9 esporos/mL. Os outros tratamentos, exceto a testemunha, chegaram a matar até 80%. O custo por hectare da glucose de milho mais farinha de soja em meio líquido, fica em R\$ 0,08 (oito centavos).

O uso de 100g de arroz não aumentou a produção final de esporos e todos os tratamentos cresceram até o máximo de 4×10^8 esporos/ml. A mortalidade também atingiu 100% das larvas para as concentrações mais altas. O custo de produção de *Bt* em arroz é de aproximadamente R\$0,08, dependendo do tipo do arroz escolhido.

Os resultados do segundo bioensaio mostraram que a produção de esporos atingiu um máximo de 4×10^8 esporos/mL, independentemente da cepa utilizada. A mortalidade atingiu 100% das larvas testadas para a concentração mais alta e as cepas T09 e 344 apresentaram mortalidade acima de 90% na concentração de 10^7 esporos/ml.

O terceiro bioensaio mostrou que a adição de glucose de milho e farinha de soja ao arroz autoclavado durante o processo de crescimento do *Bt* aumentou a produção final para 1.4×10^9 esporos/ml. Entretanto, o uso de 100 gramas de arroz não correspondeu a este aumento, sendo a produção final a mesma quando se usa 50 e 100 gramas de arroz. A mortalidade foi alta para a dose mais alta em cada tratamento.

Os resultados do quarto bioensaio mostraram que a produção final de esporos foi a mesma (entre 3 e 4×10^8 esporos/ml), tanto para 50 e 100 gramas de arroz, o que mostra que com o uso de 50 gramas tem-se economia da metade do material usado. A mortalidade foi máxima (100%) para as doses mais altas, para a maioria das cepas utilizadas (tabela 1).

Dos meios testados, o meio líquido descrito no primeiro bioensaio e o meio de arroz mais glucose de milho mais farinha de soja, são os meios mais eficientes na produção deste biopesticida. Estes resultados mostram que se pode produzir o *Bt* em meios alternativos e baratos, que podem ser usados tanto por pequenos, médios e grandes produtores rurais. A grande vantagem destes métodos é que a maioria deles pode ser executado dentro da própria fazenda. Para isto, basta ter o inóculo mantido em ambiente estéril.

Tabela 3. Percentagem de mortalidade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* com diferentes

Trat	Conc	Volume	Concent	Data de avaliação	Numero de lagartas	Morta	Vive	% mortalidade	
T1	T09	50µg/05ml	4,5 x 10 ⁷	01/03/04	24	0	1	23	
				02/03/04	0	1	23		
				03/03/04	0	2	22		
				04/03/04	0	3	21		
				05/03/04	0	4	17		
				06/03/04	0	12	8		
	T10	100µg/05ml	4,5 x 10 ⁷	01/03/04	24	0	23	2	91,6
				02/03/04	0	24	0	100	
				03/03/04	0	1	23		
				04/03/04	0	2	22		
				05/03/04	24	2	2	20	
				06/03/04	0	2	18		
T2	T09	50µg/05ml	7,8 x 10 ⁷	01/03/04	24	0	1	23	
				02/03/04	0	1	23		
				03/03/04	0	2	22		
				04/03/04	24	2	2	20	
				05/03/04	0	2	18		
				06/03/04	0	12	6		
	T10	100µg/05ml	7,8 x 10 ⁷	01/03/04	24	0	3	3	86,8
				02/03/04	2	19	1	89,8	
				03/03/04	24	0	24	0	100
				04/03/04	24	1	7	16	30,8
				05/03/04	24	4	7	13	35,0
				06/03/04	24	2	22	0	100
T3	T09	50µg/05ml	4,8 x 10 ⁷	01/03/04	24	1	3	20	
				02/03/04	0	2	18		
				03/03/04	1	5	18	21,7	
				04/03/04	24	3	15	6	
				05/03/04	0	4	2		
				06/03/04	3	19	2	90,5	
	T10	100µg/05ml	4,8 x 10 ⁷	01/03/04	24	1	5	18	21,7
				02/03/04	0	15	9		
				03/03/04	0	1	6		
				04/03/04	0	10	6	75,0	
				05/03/04	24	0	24	0	100
				06/03/04	24	2	5	17	
T4	T09	50µg/05ml	3,1 x 10 ⁷	01/03/04	24	2	2	14	
				02/03/04	0	2	14		
				03/03/04	2	7	15	31,0	
				04/03/04	24	3	17	4	
				05/03/04	0	2	2		
				06/03/04	3	19	2	90,5	
	T10	100µg/05ml	3,1 x 10 ⁷	01/03/04	24	0	24	0	100
				02/03/04	24	1	5	18	21,7
				03/03/04	0	2	18		
				04/03/04	1	5	18	21,7	
				05/03/04	24	3	15	6	
				06/03/04	0	4	2		

T1	344	50µg/05ml	4,8 x 10 ⁷	12/03/04	24	1	5	18	21,7
			4,8 x 10 ⁷	12/03/04	24	0	15	9	
			12/03/04		0	1	6		
			12/03/04		0	10	6	75,0	
			4,8 x 10 ⁷	12/03/04	24	0	24	0	100
T2	344	100µg/05ml	3,1 x 10 ⁷	12/03/04	24	2	5	17	
			12/03/04		0	2	14		
			12/03/04		2	7	15	31,0	
			3,1 x 10 ⁷	12/03/04	24	3	17	4	
			12/03/04		0	2	2		
			12/03/04		3	19	2	90,5	
			3,1 x 10 ⁷	12/03/04	24	0	24	0	100

LITERATURA CITADA

Aronson, A.E, E.S. Han, W. McGaughey & D. Johnson. 1991. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protein composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environm. Microbiol.* 57: 981-986

Beegle, C.C. & T. Yamamoto. 1992. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner Research and Development. *Can. Ent.* 124: 587-616.

Boucias, D.G. & J.C. Pedland. 1998. Principles of insect pathology. Boston. Kluwer Academic Publishers, 537p.

Carvalho, R.P.L. 1970. Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho, em condições de campo. Piracicaba: ESALQ/USP, 1970. 170p. Tese de Doutorado.

Glare, T.R. & M. O'Callaghan. 2000. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. John Wiley & Sons, Ltd., 350p.

Lambert, B. & M. Peferoen. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *Bioscience.* 42: 112-122.

Nakamura, L.K. & Dulmage, H. T. 1988. *Bacillus thuringiensis* cultures available from the US Department of Agriculture. *Tech. Bull. USDA,* 1738, 38pp.

Valicente, F. H. & Barreto, M. R. *Bacillus thuringiensis* Survey in Brazil:
Geographical Distribution and Insecticidal Activity Against *Spodoptera frugiperda* (J. E.
Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology* 32 (4): 639-644.



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato G
