



Fernando Hercos Valicente

Embrapa/Milho e Sorgo

A previsão é de que o Brasil produzisse 36 milhões de toneladas de milho em 2003, sendo que em 2001 o Brasil chegou a produzir 42 milhões de toneladas. A área cultivada com milho está em torno de 12 milhões de hectares, e o gasto anual com inseticidas químicos na cultura do milho está estimado entre U\$500 e U\$600 milhões. A lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, é uma das mais importantes pragas de milho no Brasil, e seu dano pode reduzir a produção em até 34%. O controle deste inseto é feito principalmente com inseticidas químicos. Os patógenos *Bacillus thuringiensis* e *Baculovirus* podem se tornar uma alternativa viável se usado o isolado corretamente no controle deste inseto.

O *B. thuringiensis* é uma bactéria Gram positiva, forma esporos e, produz cristal protéico durante o processo de esporulação. Ocorre naturalmente no solo, insetos mortos, água e resíduo de grãos. O cristal protéico contém delta endotoxinas, que possui propriedades inseticidas. Este cristal protéico é responsável por 20-30% da proteína total da célula. Este patógeno é ativo contra várias espécies de insetos, é considerado seguro em relação a mamíferos. Uma outra vantagem, é específico em relação aos insetos pragas alvos nas culturas. A nomenclatura até 1998 era em algarismos romanos: *cryI*, *cryII*, *cryIII*, *cryIV* e *cryV*. Hoje devido ao grande número de genes, usa-se a números arábicos: *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*...até *cry40*. Devido ao grande número de coleções no mundo, hoje a atualização dos gens *Bt* é feita através do website

[http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)

Estima-se em mais de 60.000 cepas de *Bt* em todo o mundo, e este patógeno vem sendo usado com bioinseticida há décadas. Hoje mais de 170 genes específicos que produzem d endotoxina são conhecidos, embora é relatado não sendo eficiente no controle da *S. frugiperda*. Baseado nestas informações, a Embrapa Milho e Sorgo iniciou um levantamento de cepas de *Bt* em diferentes regiões do Brasil, que incluíam regiões produtoras e não produtoras de milho, abrangendo diferentes tipos de solos e culturas ou qualquer outro microclima (resíduos de grãos, insetos mortos, solos de clima árido e semi-árido). Os principais objetivos foram: o levantamento de cepas de *Bt* em diferentes regiões do Brasil, testar cepas contra a lagarta do cartucho em laboratório e, a caracterização molecular/não molecular das cepas mais eficientes. O isolamento foi realizado através de microscópio de contraste de fase. As colônias com cristais foram reisoladas e os resultados confirmados usando microscopia de contraste de fase. Estas cepas foram usadas em bioensaios contra a lagarta do cartucho. Nos bioensaios forma usadas larvas de *S. frugiperda* de 2 dias de idade criadas em dieta artificial (laboratório). Foi usada uma suspensão de esporos e cristais. As lagartas foram acondicionadas em recipientes plásticos descartáveis (50mL) a uma temperatura de 25°C e umidade relativa

de 70% RH, fotofase de 14h/10h. A avaliação diária de mortalidade foi até o 8º dia após a infecção. Durante a realização dos bioensaios, usaram-se mais de 90.000 larvas, sendo 25larvas/ bioensaio/cepa. As cepas foram consideradas eficientes se a mortalidade foi superior a 75%. Os bioensaios repetidos para a confirmação dos resultados. Até o presente momento foram coletadas 1731 amostras de solo, de 10 diferentes estados Brasileiros, abrangendo 4 diferentes regiões e, como saldo um total de 4398 cepas isoladas. Este banco de microorganismos está localizado no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo, sendo mantidas duas cópias de cada isolado. A caracterização molecular das cepas mais eficientes mostrou que a maioria dos isolados apresentou os genes *cryIAb* e *cryIE*, algumas os genes *cryIB*, *cryI*, *cryIFb* e apenas uma cepa (1644) o *cryIC*. A literatura menciona que os genes *cryID* e *cryIC* são os mais tóxicos para a *S. frugiperda*, havendo controvérsias, sendo que outros autores mencionam *cryID*, *cryIE* e *cryIF* como sendo os mais eficientes contra a *S. frugiperda*. Baseado nesta informações, primers para os genes *cryICa*, *cryIAb* e *cryIFb*, foram desenhados. O gene *cryICa* foi então amplificado, clonado, sequenciado e depois clonado em um vetor de expressão em plantas (pCAMBIA).

Outra linha de pesquisa com o *B. thuringiensis* é o cultivo deste patógeno com produtos alternativos aos meios convencionais de cultivo. Bioensaios já foram realizados utilizando-se de glucose de milho, arroz, farinha de soja com excelentes resultados. A mortalidade é a mesma de quando se usa o meio convencional de crescimento. O custo de produção sai a R\$ 0,07 por hectare.

Os baculovírus são o grupo mais comum e mais estudado dentre os grupos de vírus patogênicos a insetos. Isto se deve ao fato de que são os vírus com o maior potencial de serem usados como agentes de controle biológico de pragas. A família Baculoviridae é composta de vírus com uma simples fita dupla circular de DNA, que infectam um grande número de artrópodos e contém 3 subgrupos: os vírus da poliedrose nuclear (NPV – nucleopoliedroses), vírus de granulose (VG- granulovírus) e os vírus não oclusos. Todos os baculovírus têm uma mesma estrutura básica: um capsídeo envelopado de forma arredondada. O nucleocapsídeo é "core" cilíndrico de DNA e proteína. Dentro do nucleocapsídeo, a fita dupla de DNA associa-se heterogeamente com uma proteína básica e forma um "core" cilíndrico.

Os baculovirus são muito eficientes em controlar a lagarta do cartucho (denominado *Baculovirus spodoptera*) a campo, tanto em aplicações com trator e pulverizador costal. Mas alguns fatores são limitantes na produção deste biopesticida em escala comercial. Dentre os problemas que afetam a produção do *Baculovirus spodoptera*, a liquefação dos insetos depois de mortos é o principal fator, pois os insetos devem ser congelados para serem coletados. Isto aumenta mão de obra, custo de produção e um grande espaço em freezers. Uma das alternativas para este problema é o silenciamento de dois genes responsáveis pela liquefação dos insetos depois de mortos. Apagando-se este gene pode-se produzir um baculovirus, silenciado em apenas dois genes e, que poderá causar a morte do inseto hospedeiro, porém não irá causar a liquefação dos tecidos da epiderme. Deste modo a produção comercial pode ser agilizada, e o preço final do bioinseticida barateado. Este é o principal entrave da produção do *B. spodoptera* em larga escala.

### **Literatura consultada:**

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. Environ. 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.

Cerón, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M. Aranda, E. Lina, L. & Bravo, A. 1994. PCR analysis of the cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 353-356.

Cerón, J., Ortiz, A., Quintero, R. Guerca, L. & Bravo, A. 1995. Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3826-3831.

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

Hawtin, R. E., T. Zarkowska, K. Arnold, C. J., G. W. Gooday, L. A. King, J. A. Kuzio & R. D. Possee. 1997.

James, C. 2002. Preview: Global status of commercialized transgenic crops: 2002. ISAAA Briefs. Nº 27. ISAAA: Ithaca, NY

King, L. A. & R. D. Possee. 1992. "The baculovirus expression system: A laboratory guide." Chapman & Hall, London/New York.

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). 2003. *Neotropical Entomology.* 32(4): 639-644

Valicente, F. H., Barreto, M. R. Vasconcelos, M.J.V., Figueiredo, J.E.F. de, & Paiva, E. 2000. Identificação através de PCR dos genes *cryI* de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagarta do cartucho, *Spodotera furgiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. Brasil: , v.29 (1).147 – 153.



---

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

---