

105

Circular  
Técnica

Sete Lagoas, MG  
Dezembro, 2008

#### Autores

Fernando Hercos  
Valicente  
Eng. Agr., PhD Controle  
Biológico/Biologia  
Molecular.  
valicent@cnpmis.embrapa.br  
Embrapa Milho e Sorgo.  
Caixa Postal 151,  
35701-970 Sete  
Lagoas, MG

## Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Bacillus thuringiensis*

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 52%, sendo o controle feito essencialmente com inseticidas químicos. As larvas mais novas consomem tecidos de folha de um lado, deixando a epiderme oposta intacta. Depois do segundo ou do terceiro instar, as larvas começam a fazer buracos nas folhas, se alimentando em seguida do cartucho das plantas de milho e produzindo uma característica fileira de perfurações nas folhas. A densidade de larvas no cartucho pode ser reduzida devido ao comportamento canibal deste inseto. O ciclo de vida do inseto é completado em 30 dias em condições de laboratório e o número de ovos pode variar de 100 a 200 por postura/fêmea (Figuras 1 e 2), sendo que um total de 1500 a 2000 ovos pode ser colocado por uma única fêmea. A lagarta pode atingir 2,5cm (Figura 3) e a fase de pupa ocorre no solo (Figura 4). Assim, percebe-se o potencial de dano que este inseto pode causar no campo (Figura 5).



Fig. 1



Fig. 2

**Figuras 1 e 2.** Massa de ovos de *Spodoptera frugiperda*. Na foto 2, observa-se a eclosão de larvas



Fig. 3



Fig. 4

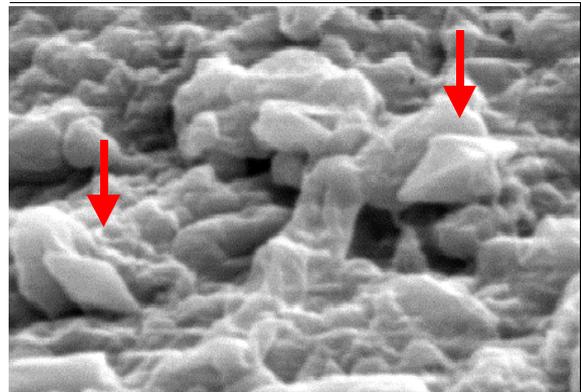
**Figura 3 e 4.** Lagarta e pupa de *Spodoptera frugiperda* respectivamente



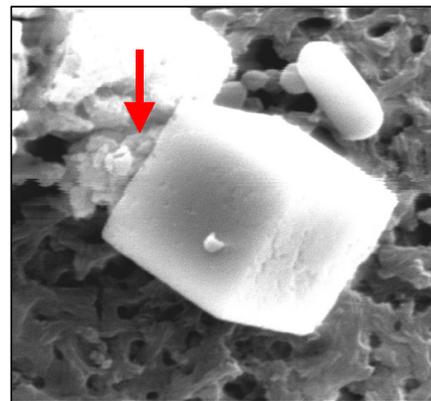
**Figura 5.** Dano causado pela lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, em planta de milho

Diante do dano que este inseto causa na lavoura do milho, o *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) pode se tornar uma alternativa viável e econômica para o controle desta praga, evitando a contaminação do meio ambiente, de aplicadores, de leitos de rios e de nascentes, além de preservar os inimigos naturais.

O *B. thuringiensis* (*Bt*) é uma bactéria Gram positiva que pode ser caracterizada pela habilidade de formar cristais protéicos durante a fase estacionária ou de esporulação. O *Bt* ocorre naturalmente em diversos habitats, incluindo solo, filoplano, resíduos de grãos, poeira, água, matéria vegetal e insetos. O cristal protéico, também chamado de delta-endotoxinas, possui propriedades inseticidas específicas. Este cristal protéico é responsável por 20-30% da proteína total da célula (Boucias & Pendland 1998) e pode ter várias formas, como bipiramidal (Figura 6), esférica, retangular, cubóide (Figura 7) e irregular.



**Figura 6.** Setas indicam o cristal de forma bipiramidal da cepa 344 de *Bacillus thuringiensis* em microscópio de varredura (Valicente & Souza, 2004)



**Figura 7.** Seta indica o cristal de forma cubóide da cepa 1644 de *Bacillus thuringiensis* em microscópio de varredura (Valicente & Souza, 2004)

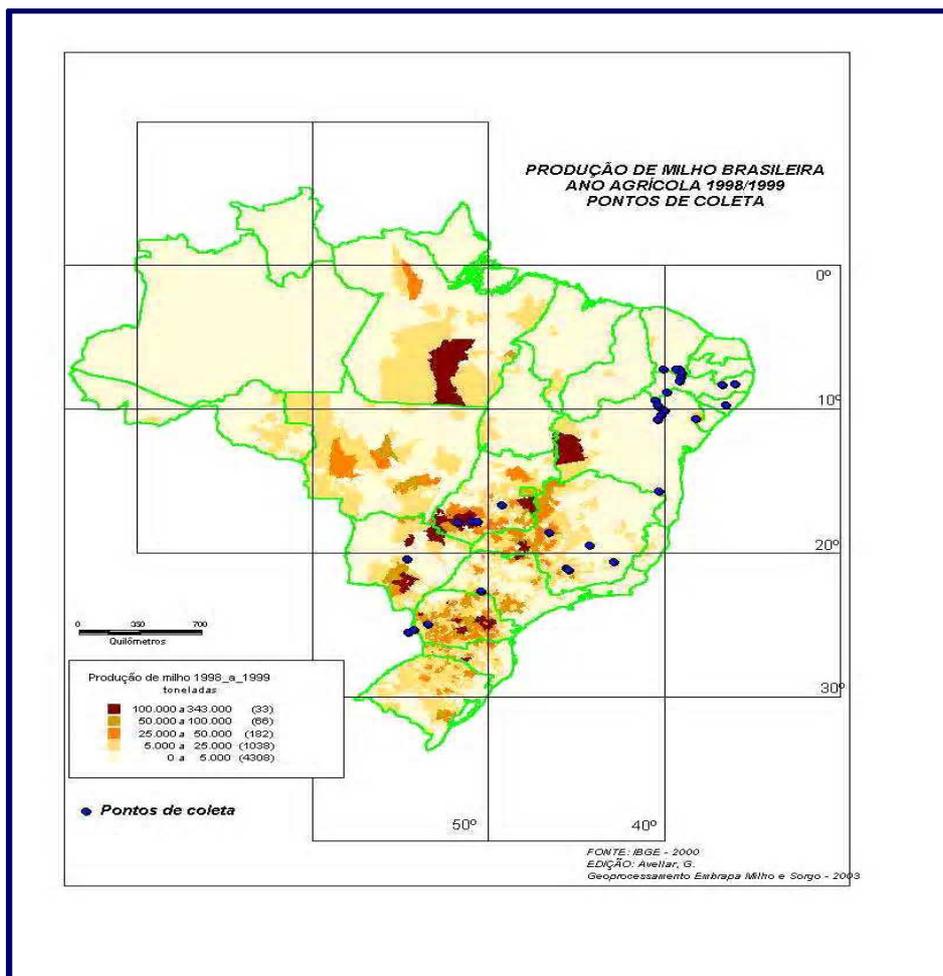
A degradação dos cristais protéicos por enzimas proteolíticas libera proteínas tóxicas menores chamadas delta-endotoxinas. A atividade das delta-endotoxinas está restrita ao trato digestivo dos insetos. Este patógeno é ativo contra várias espécies de insetos e é considerado seguro em relação aos mamíferos. Uma outra vantagem é a especificidade em relação aos insetos praga das diferentes culturas. A nomenclatura, até 1998, abrangia 5 genes principais: *cryI*; *cryII*; *cryIII*; *cryIV*; e *cryV*. Hoje, devido ao grande número de genes que são estudados e sequenciados, usam-se números arábicos: *cry1*; *cry2*; *cry3*; *cry4*; ... até *cry50*. Os genes *cry1*, *cry2* e *cry9* são

específicos em relação aos lepidópteros; *cry2*, *cry4A*, *cry10*, *cry11*, *cry17*, *cry19*, *cry24*, *cry25*, *cry27*, *cry29*, *cry30*, *cry32*, *cry39* e *cry40* são ativos contra dípteros; *cry3*, *cry7* e *cry8* contra coleópteros; *cry5*, *cry12*, *cry13* e *cry14* são ativos contra nematóides. Devido ao grande número de coleções de *Bt* no mundo, as sequências gênicas de *Bt* podem ser visualizadas no website [http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).

Estima-se que existam mais de 60.000 cepas de *Bt* em todo o mundo. Este patógeno vem sendo usado com bioinseticida há décadas (Glare & O'Callaghan 2000). Hoje mais de 200 genes específicos que produzem  $\delta$  endotoxina são conhecidos, embora sejam relatados como não muito eficientes no controle da *S. frugiperda*.

Os esporos bacterianos dormentes são extremamente resistentes e capazes de sobreviver sob condições desfavoráveis por um longo período de tempo. Entretanto, raramente é encontrado na natureza causando epizootia em populações de insetos. Enquanto a epizootia natural é rara, o isolamento de insetos é mais comum.

Objetivando o controle de insetos lepidópteros pragas da cultura do milho, a Embrapa Milho e Sorgo iniciou um levantamento de cepas de *Bt* em diferentes regiões do Brasil, incluindo regiões produtoras e não produtoras de milho, abrangendo diferentes tipos de solos e culturas ou qualquer outro micro clima (resíduos de grãos, insetos mortos, solos de clima árido e semi-árido) (Figura 8).



**Figura 8.** Mapa do Brasil representando os pontos de amostragem (em azul) nas diversas regiões brasileiras

Todos os isolados obtidos foram testados contra a lagarta do cartucho em laboratório e foi realizada a caracterização dos isolados mais eficientes. O isolamento das cepas de *Bt* foi confirmado através de microscópio de contraste de fase pela observação dos cristais protéicos. Nos bioensaios, foram usadas larvas sadias de *S. frugiperda* de 2 dias de idade criadas em dieta artificial (laboratório), sendo usada uma suspensão de esporos e cristais. As lagartas foram acondicionadas em recipientes plásticos descartáveis (50mL) a uma temperatura de 27°C e umidade relativa de 70% RH, fotofase de 14h10h.

Durante o levantamento, testaram-se mais de 90.000 larvas, sendo usadas 25 larvas/bioensaio/cepa. As cepas foram consideradas eficientes quando a mortalidade foi superior a 75%. Até o presente momento, foram coletadas 1.755 amostras de solo de 10 diferentes estados brasileiros, abrangendo quatro diferentes regiões e um saldo total de aproximadamente 4.700 cepas isoladas. Deste total, apenas 169 cepas apresentam mortalidade acima de 75%, fazendo com que pouco mais de 3% das cepas testadas tenham sido eficientes contra a lagarta do cartucho.

Este banco de cepas de *Bt* está localizado no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo, onde são mantidas duas cópias de cada isolado, uma conservada a -20°C e outra a -80°C. As regiões Sul e Centro-Oeste fornecem uma grande quantidade de cepas quando amostras de solo são usadas como fonte de isolamento. A literatura menciona que 13 sorovariedades de *B. thuringiensis* foram testadas em larvas de *S. frugiperda* e relata que os serovars *galleriae*, *aizawai* e *tolworthi* causaram mortalidade acima de 90%. Estes dados são parcialmente confirmados pelos resultados de laboratório em que apenas a sv *tolworthi* matou acima de 95%. Entretanto, as sv *galleriae* e *aizawai* não causaram mortalidade acima de 15%. Bohorova et al. (1996) 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%. Este número são importantes porque mostram a dificuldade de se encontrar isolados de *Bt* que sejam eficientes no controle da lagarta do cartucho. Esta dificuldade em controlar as lagartas de *S. frugiperda* com *Bt* é confirmada por Baum (1999), que afirma que pode haver variação dentro do mesmo gênero.

A PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) é uma das técnicas mais usadas na caracterização de cepas de *Bt* (Carozzi 1992, Cerón et al. 1994, Cerón et al. 1995, Bravo et al. 1998, Valicente et al. 2000). Dentre as cepas mais eficientes da coleção da Embrapa Milho e Sorgo, a maioria dos isolados apresentou os genes *cry1Ab* e *cry1E*, algumas os genes *cry1B*, *cry1*, *cry1Fb* e apenas uma cepa até o momento (1644) o *cry1C* (Valicente et al. 2000, Valicente 2003). Bravo et al. 1998 fizeram uma caracterização de genes *cry* de uma coleção mexicana de *Bt* e concluíram que os genes *cry1D* e *cry1C* foram os mais tóxicos para lagartas de *S. frugiperda* e de *S. exigua*.

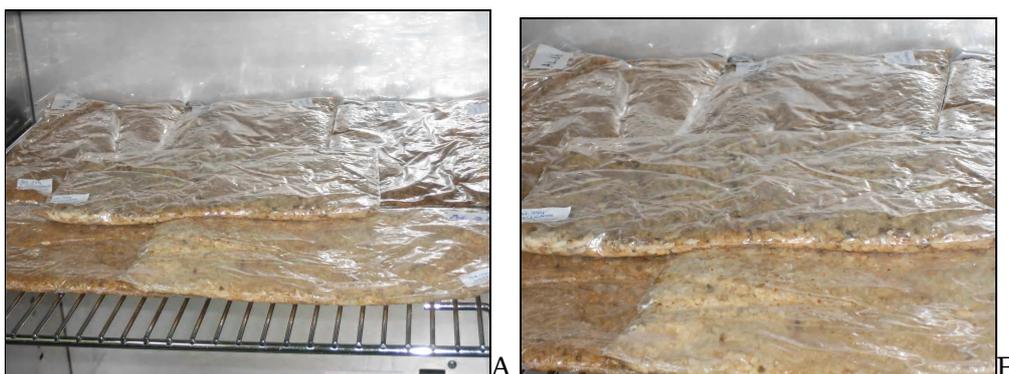
O *B. thuringiensis* pode ser cultivado usando meios alternativos ou subprodutos da indústria e da agricultura. O *Bt* necessita de carbono, nitrogênio e traços de sais minerais para seu crescimento. Várias fontes de carbono a preços reduzidos podem ser usadas, tais como glucose de milho, melão de cana, melão de beterraba e amido de alguns cereais. Como fonte de nitrogênio, podem ser usadas farinha de soja, extrato de soja, levedura e água de maceração de milho. Os sais inorgânicos essenciais são cálcio, zinco, manganês e magnésio. A atividade tóxica do *Bt* vai depender do meio e da cepa utilizados. Valicente et al. (2007a) testaram várias concentrações de carbono e nitrogênio para o crescimento do *Bt*. Os melhores resultados (massa celular, unidades formadoras de colônia, esporos viáveis e mortalidade) foram obtidos quando se usou uma concentração de nitrogênio 3 vezes maior que a de carbono.

O *Bt* pode ser produzido tanto em fermentação líquida como em meio sólido. Em um meio com bom suplemento de carbono, nitrogênio e fósforo,

o *Bt* cresce vegetativamente e a esporulação é reprimida. No final da fase vegetativa, a exaustão dos nutrientes do meio induz o início da esporulação. Um fator determinante na produção de biopesticidas à base de *Bt* é a oxigenação do meio durante o processo de fermentação. Valicente & Zanasi (2005) inovaram o processo de fermentação em meio sólido utilizando 50g de arroz como substrato. O arroz foi enriquecido com fontes de carbono, nitrogênio, sais minerais e posteriormente autoclavado em sacos de polipropileno. Após a esterilização, o material foi inoculado com a cepa adequada previamente crescida em meio líquido. Esta mistura foi crescida a 30°C por 4 dias para completa esporulação (Figura 9). O biopesticida produzido deste modo é barato e fácil de ser aplicado. Após o período de 4 dias, o material deve ser congelado até o uso.

produzir um biopesticida à base de *Bt* usando fontes alternativas de carbono e nitrogênio. O chorume a 4% mostrou-se capaz de fornecer as condições ideais para o crescimento do *Bt*, gerando um número satisfatório de células viáveis, massa celular e alta mortalidade em lagartas sadias de 2 dias de idade.

Resultados de pesquisa têm mostrado que o *Bt* pode ser produzido em meios alternativos, resíduos da indústria e com materiais de baixo custo. A grande vantagem destes sistemas de produção é que este biopesticida pode ser usado tanto por pequenos como por médios e grandes produtores rurais. Alguns métodos de produção do *Bt* podem ser realizados dentro da própria fazenda; para isto, basta obter a cepa de *Bt* específica conservada em ambiente estéril.



**Figura 9.** A - *B. thuringiensis* crescido em arroz contendo glucose de milho e farinha de soja mantido a 30°C por 5 dias em estufa de crescimento. B – Detalhe da coloração do arroz usado como substrato para crescimento de *B. thuringiensis*

Outra pesquisa que vem sendo realizada na Embrapa Milho e Sorgo é o uso de esterco líquido proveniente das fezes de suínos (chorume) para a produção de um biopesticida à base de *B. thuringiensis*. O chorume é rico em carbono, nitrogênio e vários micronutrientes necessários para o crescimento do *Bt*. Valicente *et al.* (2007b) testaram meios alternativos para o crescimento do *Bt* em fermentação líquida usando meios contendo glucose de milho e farinha de soja, meio Luria Bertani e o chorume a 4%. Os resultados foram promissores, mostrando a viabilidade de se

### **Considerações sobre a aplicação de biopesticida à base de *Bt***

A aplicação deste patógeno na cultura do milho deve respeitar alguns fatores importantes. O primeiro deles é que a cultura deve ser monitorada semanalmente para se detectar o nível de ataque da lagarta do cartucho na lavoura. Em determinadas regiões o ataque desta praga se inicia uma semana após a germinação das sementes, o que faz com que o produtor deva conhecer os sinais iniciais do ataque na cultura do milho (Figura 10).



**Figura 10.** Ataque inicial da lagarta do cartucho, *S. frugiperda*, em planta de milho em que observam-se pequenas raspaduras da folha de milho pelo inseto

Deve-se também respeitar a arquitetura da planta de milho, que cresce verticalmente, e, havendo necessidade, deve-se realizar aplicações semanais do biopesticida do mesmo modo como é feito com o uso de produto químico.

Realizar as pulverizações sempre à tarde para se evitar uma maior incidência de raios UV (ultravioletas). Os raios UV são um dos principais fatores de inativação deste biopesticida a campo.

Outro ponto a ser considerado é usar uma quantidade maior de água para que se consiga atingir o inseto dentro do cartucho, local preferido da lagarta, juntamente com o uso do espalhante adesivo para melhorar a qualidade da aplicação, uniformidade da calda e fixar o produto na folha

(Figuras 11A e 11B). Para se usar uma menor quantidade de água, deve-se ter o equipamento apropriado para baixo volume. Verificar a umidade relativa do ar porque, se a mesma estiver muito baixa e as gotas muito pequenas, pode-se perder muito com a evaporação da calda antes mesmo de o produto atingir a folha.

O que ocorre muitas vezes é que o produtor, para ter um maior rendimento, faz a aplicação com uma quantidade muito pequena de água e uma maior velocidade do trator, o que resulta numa má aplicação de qualquer produto, tanto químico quanto biológico, não realizando, deste modo, um controle satisfatório da lagarta do cartucho.



**Figura 11. A** – Trator realizando aplicação com velocidade reduzida e 300L de água por hectare, molhando completamente as plantas de milho



**Figura 11. B** – Planta de milho recém-pulverizada com 300L de água/ha e espalhante adesivo. As folhas estão totalmente molhadas pelo biopesticida

## Literatura consultada

- Aronson, A.E., E.S. Han, W. McGaughey & D. Johnson. 1991. The solubility of inclusion proteins form *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protein composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environm. Microbiol.* 57: 981-986
- Baum, A.B., T.B. Johnson & B.C. Carlton. 1999. *Bacillus thuringiensis* – Natural and recombinant biopesticide products. p.189-209. In F.R. Hall & J.J. Menn (eds.), *Methods in Biotechnology: Biopesticides: use and delivery.* 626p.
- 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.
- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontivieros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Lina, L., Villalobos, F. J. Peña, G., Nuñez-Valdez, M-E., Soberón, M., Quintero, R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4965-4972, 1998
- Carozzi, N.B., V.C. Kramer, G.W. Warren, S. Evola & M.G. Koziel. 1991. Prediction of insecticidal of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3057-3061
- 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 analasys 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.
- James, C. 2002. Preview: Global status of commercialized transgenic crops: 2002. ISAAA Briefs. Nº 27. ISAAA: Ithaca, NY
- Lambert, B. & M. Peferoen. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *Bioscience.* 42: 112-122
- Martigoni, M.E. & I. Iwai. 1986. A catalogue of viral diseases of insects, mites, and ticks. *U.S. Dep. Agric. For. Serv. Pac. Northwest Res. Stn. Gen. Tech. Rep. PNW-195*
- Nakamura, L.K. & Dulmage, H. T. 1988. *Bacillus thuringiensis* cultures available from the U. S. Department of Agriculture. *Tech. Bull. USDA*, 1738, 38pp.
- Valicente, F. H. 1989. Levantamento dos inimigos naturais de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes regiões do estado de Minas Gerais. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil.* Brasil: v.18 (1):119 – 127
- Valicente, F. H., Barreto. 1999. Levantamento dos inimigos naturais da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), na região de Cascavel, PR. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil.* Brasil: , v.28 (2):333 – 337
- Valicente, F. H. 2003. *Bacillus thuringiensis*: uso de isolados tropicais no controle da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*. In Livro de Resumos. 8º Siconbiol. Águas de São Pedro. p.60

Valicente, F. H. & Barreto, M. R. 2003. *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, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. Brasil, v.29 (1):47 – 153

Valicente, F.H. & Souza, I.R.P. 2004. Cultivo e preparo de *Bacillus thuringiensis* para microscopia eletrônica de varredura. In Resumos. XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo. Cuiabá. p.146

Valicente, F. H., Lopes, A. R. de S. & Mourão, A. H.C. 2007a. Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* based biopesticide. In 40<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. Quebec City – Université Laval. p.77.

Valicente, F. H., Leite, M. I. S., Freire, F. L. & Vieira, C. M. 2007b. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using a commercial lab medium and agricultural by-products as nutrient sources. In XVI International Plant Protection Congress. Glasgow. p.448-449. Vol.II

**Circular  
Técnica, 105**

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Milho e Sorgo**  
**Endereço:** Rod. MG 424 km 45 - Caixa Postal 151  
**Fone:** (31) 3027-1100  
**Fax:** (31) 3027-1188  
**E-mail:** sac@cnpmis.embrapa.br

1ª edição  
1ª impressão (2008): 200 exemplares

**Comitê de  
publicações**

**Presidente:** Antônio Álvaro Corsetti Purcino  
**Secretário-Executivo:** Paulo César Magalhães  
**Membros:** Andrea Almeida Carneiro, Carlos Roberto Casela, Cláudia T. Guimarães, Clenio Araujo, Flavia França Teixeira, Jurandir Vieira Magalhães

**Expediente**

**Revisão de texto:** Clenio Araujo  
**Editoração eletrônica:** Tânia Mara Assunção Barbosa