

Comunicado 108

Técnico

ISSN 9192-0099
Brasília, DF
Outubro, 2004

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE BIOENSAIO DE DOSE CONTRA O BICUDO DO ALGODOEIRO (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843) UTILIZANDO ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis*.

Martins, E. S., Praça, L. B., Dumas, V. F. &
Rose G. Monnerat

Resumo: A cotonicultura é uma das principais atividades agrícolas do Brasil, assumindo um grande interesse econômico tanto no setor agrícola, quanto no industrial. A vulnerabilidade a pragas representa o principal problema dessa cultura. Por ano são gastos milhões de dólares com aplicações de pesticidas na lavoura de algodão, o que aumenta os gastos de produção e os riscos

ambientais. Uma alternativa viável é o uso de agentes de controle biológico, que não causam danos ao meio ambiente e reduzem os gastos com químicos. Um desses agentes é o *Bacillus thuringiensis* (Bt), uma bactéria que produz inclusões protéicas de efeito entomopatogênico. Em trabalhos anteriores foi observada a ação tóxica de algumas estirpes de Bt, do banco de *Bacillus* spp. da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,

ao bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*). Entretanto, a metodologia de realização de bioensaios para a determinação da concentração letal para matar 50% das larvas (CL₅₀) não estava satisfatória, visto que a maior dose não matava mais de 90% das larvas, além da grande variação entre os resultados obtidos nas repetições. Este trabalho teve como objetivo o aprimoramento da metodologia de bioensaio de dose, visando a determinação da CL₅₀ de estirpes de *B. thuringiensis*.

Abstract:

Cotton is one of the most important crops in Brazil, with relevant economical interest both in agricultural and industrial sector. The susceptibility to pests represents the major problem of this crop. Millions of dollars are expensed by year in pesticide application on the field, which involves the cost of production and environmental hazards. One of the possibilities to control insects is the utilization of biological control agents, that are environmentally safe also reduces the chemical utilization. One of these agents is *Bacillus*

thuringiensis (Bt), a bacterium that produces protein inclusions with entomopathogenic effects. In previous works it was observed that some Bt strains of the Embrapa's collection of *Bacillus* spp. are toxic to boll weevil. However, the bioassay method to determine the lethal concentration to kill 50% of larvae (LC₅₀) was not good enough, because the highest dosage did not kill more than 90% of the larvae and there was a significant variation between the results in different replications. The aim of this work was improve the bioassay method in order to determine the LC₅₀ of *B. thuringiensis* strains.

1 – INTRODUÇÃO

A cultura do algodão está classificada entre as principais culturas agrícolas do Brasil, assumindo grande importância econômica, social e política, tanto em áreas rurais quanto nos setores industriais.

Na maioria dos países onde o algodoeiro é cultivado comercialmente, a vulnerabilidade às pragas representa o principal problema dessa cultura. Sem alternativas de controle mais eficazes, o agricultor acaba por utilizar produtos químicos para o combate de pragas. Em todo o mundo, formas alternativas para o combate de pragas, que sejam menos prejudiciais ao ser humano e ao ambiente e que sejam capazes de reduzir o tamanho das populações de pragas para níveis que não causem danos econômicos às lavouras, têm sido avaliados.

Uma alternativa para o controle de pragas é a utilização de agentes microbianos com atividade entomopatogênica. Entre estes, destaca-se o *Bacillus thuringiensis* (Bt), que é uma bactéria aeróbia, gram-positiva, da família Bacillaceae caracterizada pela produção, no momento de sua esporulação, de inclusões protéicas cristalinas, que são eficazes contra vários grupos de insetos (FEITELSEN et al., 1992). Estas proteínas são produzidas sob forma de protoxinas, sendo transformadas

em peptídios tóxicos no intestino do inseto pela ação do pH alcalino intestinal e de proteases. A proteína ativada causa lise das células epiteliais e a morte das larvas (ARONSON et al., 1986).

Uma das vantagens da utilização de *B. thuringiensis* é sua especificidade aos insetos sensíveis à ação de suas toxinas, o efeito não poluente ao meio ambiente, a inocuidade aos mamíferos e invertebrados e ausência de toxicidade às plantas (WHITELEY e SCHNEPF, 1986; OMS, 1987). Experimentos *in vivo* nos quais administram-se altas doses de proteínas Cry a outros organismos, que não insetos, não têm demonstrado alteração na atividade metabólica dos mesmos, comprovando sua inocuidade aos demais organismos (SHIMADA et al., 2003).

Um dos insetos susceptível à ação do *B. thuringiensis* é o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman). Este coleóptero é uma praga de difícil controle, pois seu desenvolvimento larval se dá dentro das maçãs do algodoeiro, não sendo,

portanto, passível de ser controlada por biopesticidas ou por métodos convencionais. Na fase adulta este inseto alimenta-se dos botões florais e maçãs do algodoeiro, onde faz a oviposição. A principal forma de controle tem sido a utilização de produtos químicos, cuja aplicação exige um grande investimento, onerando ou, mesmo, em alguns casos, inviabilizando a produção.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), possui um banco de *Bacillus* spp. entomopatogênicos, onde estão armazenadas diferentes estirpes de *B. thuringiensis*, originárias de amostras de solo e água de diferentes regiões do país (MONNERAT et al., 2001). Essas estirpes têm sido prospectadas quanto a toxicidade ao bicudo e quatro foram selecionadas e testadas em bioensaios de dose a fim de se calcular a concentração letal para 50% da população (CL₅₀). Com base na literatura, algumas metodologias como as descritas por MARTINS et al. (2001), Monnerat et al. (2000) e Praça et al. (2003) foram testadas. Porém os resultados obtidos não

foram satisfatórios uma vez que os valores de mortalidade apresentados entre diferentes diluições eram muito próximos dificultando o cálculo estatístico da CL₅₀. A fim de se obter um resultado mais preciso, desenvolveu-se uma nova metodologia de bioensaio adaptada de Praça et al. (2003).

O objetivo deste trabalho foi aprimorar uma metodologia de bioensaio de dose, para que fosse possível a determinação da CL₅₀ de estirpes de *B. thuringiensis*.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

Os insetos utilizados para o bioensaio foram provenientes do laboratório de criação de insetos do Cenargen, onde é feita a criação massal de bicudo do algodoeiro, mantida conforme descrito por Monnerat et al. (2000).

Inicialmente as estirpes foram cultivadas por 72h em meio NYSM (YOUSTEN, 1984) a 28°C e 200 rpm. Após o cultivo, estas foram centrifugadas a 12.800 x g por 30 minutos, a 4°C (centrífuga BR4i, Jouan), congelados “overnight” e

liofilizados 18 horas em liofilizador Labconco Lyphlock modelo 18. Depois de liofilizado, o material foi pesado para a obtenção das cinco doses usadas no bioensaio (Tabela 1), Cada dose pesada foi dissolvida em Tween 0,01% e as suspensões foram incorporadas a 35 mL de dieta (ágar 0,8g, levedo de cerveja 1,2g, gérmen de trigo 1,2g, pharmamédia 0,8g, proteína de soja 2,0g, sacarose 1,2g, sais minerais 0,2g, ácido ascórbico 0,4g, ácido sórbico 0,05g, nipagim 0,04g e solução vitamínica 200 L) conforme descrito por Martins et al. (2001) e, em seguida, a dieta foi vertida em placas de Petri. Após

solidificação foram feitos 48 furos. Em cada furo foi colocada uma larva neonata. Foram testadas cinco doses e um controle. O bioensaio foi mantido em câmara de incubação com fotofase de 14/10 e temperatura de 27°C. Uma semana após o ensaio fez-se a leitura do bioensaio e determinou-se a CL₅₀ através de análise de Probit (FINNEY,1971). Para comparação dos resultados obtidos foram feitos ensaios com a linhagem *B. thuringiensis tenebrionis* denominada S1122, que é a linhagem padrão para insetos da ordem Coleoptera.

Tabela 1 – Concentrações avaliadas final no bioensaio

Dose	Quantidade em mg de bactéria liofilizada	Quantidade em mL de Tween 0,01%	Quantidade em mL de dieta	Concentração final (mg/mL)
1	60	5,0	35,0	1,50
2	40	5,0	35,0	1,00
3	20	5,0	35,0	0,50
4	10	5,0	35,0	0,25
5	04	5,0	35,0	0,10

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 2. Foram obtidos dois grupos estatisticamente distintos. O grupo A é composto pelas estirpes S601, S1806 e S1122 e o grupo B composto pelas estirpes S325 e S811.

Tabela 2. CL₅₀ das estirpes de *B. thuringiensis* testadas em larvas do bicudo-do-algodoeiro.

Linhagem	CL ₅₀ (mg/mL)	Intervalo de Confiança	
		Limite inferior (mg/mL)	Limite superior (mg/mL)
S601	0,087 A	0,051	0,117
S1806	0,175 A	0,114	0,236
S1122 (Btt)	0,222 A	0,029	0,446
S325	1,099 B	0,583	5,919
S811	1,441 B	0,674	18,308

Os valores obtidos em cada coluna, seguidos pela mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste Tukey.

4 – CONCLUSÃO:

Os resultados obtidos mostram a eficiência da metodologia, uma vez que através desta pode-se obter resultados de CL₅₀ com $p < 0,05$ e com valores de mortalidade mais próximos de 100% e 0% da população, o que torna os resultados estatisticamente

mais confiáveis do que os obtidos através de outras metodologias já testadas. A metodologia apresentada a otimiza o trabalho e aumenta o índice de confiabilidade dos experimentos.

ARONSON, A. L.; BECKMAN, W. Y.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiology Review**, v. 50, p. 1-24, 1986.

CASTRO, L. A. B. Plantas transgênicas resistentes a insetos: perspectivas e limitações. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 319-424, 1992.

DIAS, S. C.; OLIVEIRA NETO, O. B.; SÁ, M. F. G.; MONNERAT, R. G. **Desenvolvimento de Metodologia de Bioensaio utilizando *Bacillus thuringiensis* Contra o Bicudo do Algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 5 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 42).

FEITELSEN, J. S.; PAYNE, J; KIM, L. *Bacillus thuringiensis* insects and beyond. **Biotechnology**, New York, v. 10, p. 271-275, 1992.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 333 p.

FRANÇA, F. H. **Cotton production in Brazil**. [S.l.: s. n.], 1993. 23p.

MARTINS, E. S.; PRAÇA, L. B.; MONNERAT, R. G. Caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficazes contra o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843). In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3.,

2001, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR, 2001. p. 490.

MONNERAT, R. G.; DIAS, S. C.; OLIVEIRA NETO, O. B. de; NOBRE, S. D.; SILVA WERNECK, J. O.; SÁ, M. F. G. **Criação massal do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 4 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 46).

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; SILVA WERNECK, J. O. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias entomopatogênicas do gênero *Bacillus***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 65 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 60).

OMS. **Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of biocontrol agents of disease vectors**. [Genebra]: UNDP: WORLD BANK: WHO, 1987. 41 p. Special Programme for Research and Training in tropical Diseases, TDR/BCV/IC-GE/87.3.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 34 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 41).

SHIMADA, N.; KIM, Y. S.; MIYAMOTO, K.; YOSHIOKA, M.; MURATA, H. Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ab toxin on mammalian cells. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokio, v. 65, n. 2, p. 187–191, 2003.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of**

Microbiology, Palo Alto, CA, v. 40, p. 549-576, 1986.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors relateds to its potencial as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnological Processes**, New York, v. 3, p. 315-343, 1984.

<p>Comunicado Técnico, 108</p> <p>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento</p>	<p>Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Serviço de Atendimento ao Cidadão Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624 http://www.cenargen.embrapa.br e.mail:sac@cenargen.embrapa.br</p> <p>1ª edição 1ª impressão (2004): 150 unidades</p>	<p>Comitê de Publicações</p> <p>Expediente</p>	<p>Presidente: <i>Maria Isabel de Oliveira Penteadó</i> Secretário-Executivo: <i>Maria da Graça Simões Pires Negrão</i> Membros: Arthur da Silva Mariante Maria Alice Bianchi Maria da Graça S. P. Negrão Maria de Fátima Batista Maria Isabel de O. Penteadó Maurício Machain Franco Regina Maria Dechechi Carneiro Sueli Correa Marques de Mello Vera Tavares de Campos Carneiro Supervisor editorial: <i>Maria da Graça S. P. Negrão</i> Normalização Bibliográfica: <i>Maria Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado</i> Editoração eletrônica: <i>Maria da Graça Simões Pires Negrão</i></p>
---	--	--	---