

TÉCNICAS DE PRODUÇÃO E USO DE ENTOMOPATÓGENOS NO CONTROLE DA *Spodoptera frugiperda*

FERNANDO HERCOS VALICENTE¹, EDMAR DE SOUZA
TUELHER², CARLOS EDUARDO COSTA PAIVA³

1. INTRODUÇÃO

A área cultivada com milho no Brasil está em torno de 12 milhões de hectares, e o gasto anual com inseticidas químicos na cultura do milho está estimado entre US\$ 500 e US\$ 600 milhões. A lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, é uma das principais pragas da cultura do milho no Brasil cujo ataque pode reduzir a produção de grãos em até 34%. As larvas mais novas consomem tecidos de folha de um lado, deixando a epiderme oposta intacta. Depois de segundo ou terceiro instar, as larvas começam a fazer buracos nas folhas, se alimentado em seguida do cartucho das plantas de milho, produzindo uma característica fileira de perfurações nas folhas. A densidade de larvas no cartucho pode ser reduzida devido ao comportamento canibal deste inseto. Seu ciclo de vida é completado em 30 dias em condições de laboratório e, o número de ovos pode variar de 100 a 200 por postura/fêmea (Fig. 1A), sendo que um total de 1.500 a 2.000 ovos pode ser colocado por uma única fêmea. A lagarta pode atingir 2,5cm (Fig. 1B) e a fase de pupa ocorre no solo (Fig. 1C). Assim, percebe-se o potencial de dano que este inseto pode causar no campo (Fig. 1D).

O controle deste inseto no campo é feito essencialmente com inseticidas químicos, onerando o custo de produção. O controle biológico vem se tornando uma alternativa viável no controle da lagarta do cartucho, não polui rios, nascentes, não possui efeito tóxico sobre aplicadores, agregando valor ao produto final. O controle biológico pode ser definido como sendo o uso de parasitoides, predadores e patógenos no controle de insetos. Os patógenos *Bacillus thuringiensis* e *Baculovirus* são agentes de

¹ Eng^o Agr^o, Ph.D. - Pesq. Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35.701-970 Sete Lagoas, MG. valicent@cnpms.embrapa.br

² Eng^o Agr^o, MSc, Bolsista Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35.701-970 Sete Lagoas, MG. estuelher@yahoo.com.br

³ Eng^o Agr^o, Bolsista Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35.701-970 Sete Lagoas, MG. cecostapaiva@yahoo.com.br

controle que se usados de forma adequada, podem controlar eficientemente este inseto a campo.

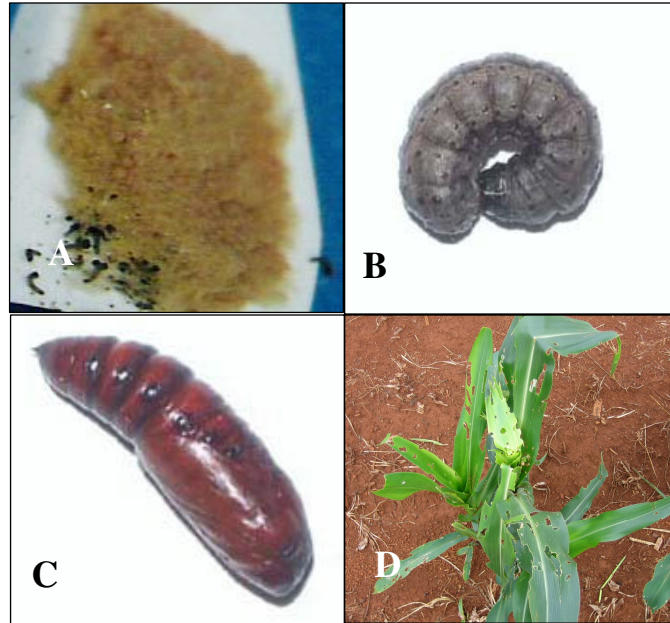


Figura 1 – Fases do ciclo de vida da lagarta do cartucho do milho: (A) Massa de ovos de *Spodoptera frugiperda* podendo-se observar a emergência de lagartas; (B) lagarta; (C) pupa e (D) danos causados em planta de milho.

2. NOVOS AVANÇOS E DESAFIOS PARA A PRODUÇÃO COMERCIAL DO NPV DA LAGARTA DO CARTUCHO DO MILHO

Os *Baculovirus* podem se tornar uma alternativa viável, econômica e eficiente quando usados corretamente no controle da lagarta do cartucho do milho. 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 artrópodes 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.

Os baculovirus são muito eficientes em controlar a lagarta do cartucho (denominado *Baculovirus spodoptera*) no campo, tanto em aplicações com trator ou pulverizador costal. Mas dois fatores são limitantes na produção deste biopesticida em escala comercial. O primeiro é a liquefação do tegumento das lagartas depois de mortas (Fig. 2A), que devem ser congeladas para serem coletadas, descongeladas e, posteriormente formuladas. Esta liquefação dos tegumentos é causada principalmente pelos genes da quitinase e da catepsina. Isto aumenta a mão de obra, custo de produção e há a demanda de um grande espaço em laboratório com freezers. O segundo fator é que a lagarta do cartucho é canibal fazendo com que as mesmas tenham que ser individualizadas a partir do terceiro ínstar. Esta individualização faz com que o sistema de produção necessite de mais mão de obra onerando o custo do produto final.

Como estes dois fatores são os mais importantes e limitantes num sistema de produção do *B. spodoptera* em larga escala, alguns resultados relevantes foram alcançados:

1- Foi descoberto em 2006 um isolado de *B. spodoptera* (isolado 6) que mata a lagarta do cartucho, mas não rompe o tegumento do inseto imediatamente após a sua morte (Fig. 2B). Este fato é incomum já que todos os baculovírus descritos como patogênicos a lagarta do cartucho causam o rompimento do tegumento do inseto depois de morto, causando muita perda de líquido interno. O não rompimento do tegumento é um fator que facilita o manuseio do inseto até o seu processamento, além de necessitar de menos lagartas por dose.

2- Este baculovírus encontrado multiplica-se normalmente em hospedeiro alternativo não canibal, *Spodoptera exigua*. A lagarta do cartucho apresenta alto grau de canibalismo, o que acarreta muita mão de obra para a individualização das mesmas. A ausência de canibalismo reduz o custo da mão-de-obra dentro da biofábrica, facilitando o sistema de produção sendo que as lagartas não necessitam ser individualizadas.

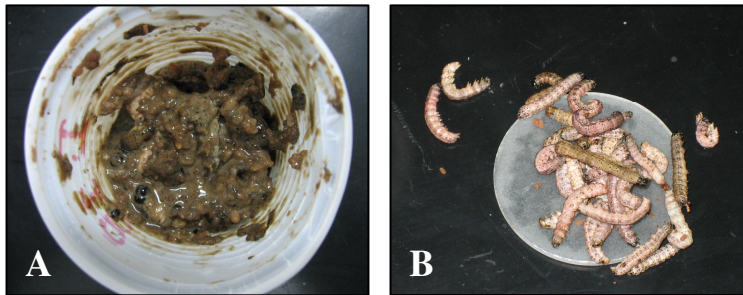


Figura 2 – Lagartas de *S. frugiperda* mortas por *B. spodoptera*, podendo-se observar (A) o rompimento do tegumento da lagarta depois de morta e (B) sem o rompimento.

2.1 CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA CATEPSINA E QUITINASE

Foi realizado o corte do genoma dos isolados 6 (não rompe) e do isolado 19 (rompe o tegumento) com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, não havendo diferença entre os isolados 6 e 19. Os genes da quitinase e da catepsina foram detectados através da PCR no isolados 6 e 19, sendo que as regiões destes dois genes nos dois isolados produziram um amplicon cujo tamanho foi o mesmo para os dois isolados. O alinhamento das seqüências do isolado 6 e do isolado 19 revelou uma deleção de uma base localizada dentro do gene da quitinase. A mudança no quadro de leitura causada por esta deleção resulta na formação de um “stop codon” 15 pares de bases abaixo da mutação.

2.2. MULTIPLICAÇÃO DE *B. spodoptera* EM HOSPEDEIRO ALTERNATIVO NÃO CANIBAL

A utilização de um hospedeiro não canibal para a multiplicação e produção do baculovírus é uma alternativa para diminuir os custos de produção do bioinseticida. Porém, pode haver a produção de formas latentes, ocorrerem mutações ou redução na produtividade por lagarta ou ainda redução na taxa de infecção após várias passagens seriais em hospedeiro alternativo. Dessa forma, foi realizada em laboratório a multiplicação do vírus de *S. frugiperda* (*Sf*NPV) em *S. exigua*. No sistema de produção de bioinseticida espera-se que o material proveniente dessa passagem possa ser utilizado no campo. Essa multiplicação do baculovírus em *S. exigua*

não mostrou diferença significativa no números de lagartas equivalente (LE) por dose no hospedeiro alternativo se comparado a LE para *S. frugiperda*. A mortalidade em *S. frugiperda*, no entanto, foi 6% menor com o vírus multiplicado em *S. exigua*, o que pode demandar que a dose a ser utilizada deva ser ajustada para um controle satisfatório (Fig. 3).

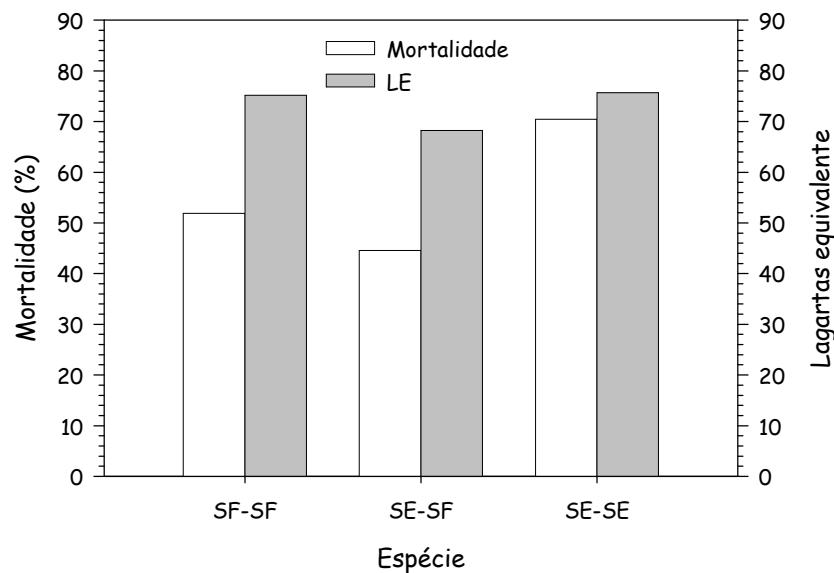


Figura 3 – Mortalidade e número de lagartas equivalente por dose em lagartas inoculadas com SfMNPV após multiplicação em *S. frugiperda* e *S. exigua*.

2.3. EXPERIMENTOS DE CAMPO

Experimentos realizados na Embrapa Milho e Sorgo e na estação experimental em Janaúba mostraram viabilidade da utilização do *B. spodoptera* para o controle da lagarta do cartucho bem como sobre a manutenção do parasitismo natural.

Em um primeiro experimento, em Sete Lagoas, foram avaliadas parcelas tratadas com baculovírus na sua formulação padrão, em pó molhável, e inseticida. Os tratamentos foram baculovírus (1×10^6 poliedros/mL) em 1, 2, 3 e 4 aplicações em intervalos semanais durante o ciclo da cultura, inseticida Tracer[®] em pulverização única na concentração recomendada pelo fabricante e uma testemunha sem pulverização. As plantas foram

infestadas artificialmente e as pulverizações realizadas 24 horas depois. Após 48 horas, as plantas foram coletadas e as lagartas individualizadas em copos plásticos e alimentadas com dieta artificial. Foi observado diminuição do número total de lagartas e do número de lagartas parasitadas ao longo das semanas em todos os tratamentos (Fig. 4). O parasitismo ocorreu principalmente por insetos da ordem Hymenoptera (gêneros *Campoletis*, *Chelonus*, *Cotesia*, *Eiphosoma* e *Exasticolus*). A mortalidade total (devido ao baculovírus mais parasitismo) foi semelhante em todos os tratamentos variando de 72-86% e 25-72% na primeira e segunda avaliação, respectivamente. Com alta mortalidade observada na primeira avaliação e baixo número de lagartas encontradas na 3ª e 4ª avaliações verificou-se um controle satisfatório de *S. frugiperda*.

Dois outros experimentos foram realizados comparando-se a eficiência de dois isolados de *B. spodoptera* (6-NR e 19-R) na formulação em pó molhável, em duas diferentes concentrações (10^6 e 10^7 poliedros/mL), avaliando-se a mortalidade pelo baculovírus e o parasitismo natural, em Janaúba-MG e em Sete Lagoas-MG, com infestação artificial em Sete Lagoas e natural em Janaúba. A pulverização do *Baculovirus* foi realizada 24 horas após a infestação, 48 horas depois as plantas foram coletadas e as lagartas individualizadas em copos plásticos e alimentadas com dieta artificial. A mortalidade de *S. frugiperda* foi maior na concentração de 10^7 pol/mL, apresentando-se esta igual para os isolados testados. Esse comportamento foi observado tanto no experimento realizado em Janaúba quanto em Sete Lagoas. Analisando-se o conjunto mortalidade mais parasitismo o Isolado 6-NR causou uma maior mortalidade em Janaúba em relação ao 19-R e na concentração de 10^7 pol/mL. Os formulados de *B. spodoptera* não afetaram o parasitismo natural em *S. frugiperda* (Fig. 5).

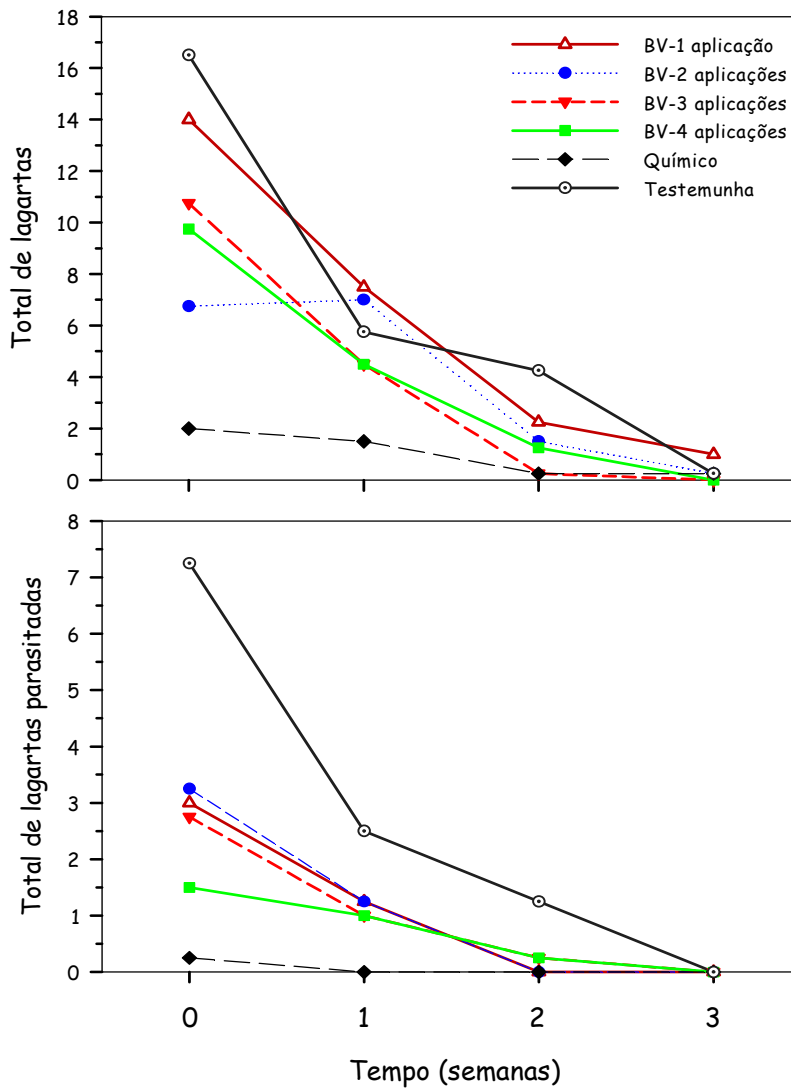


Figura 4 – Número total de lagartas do cartucho (superior) e de lagartas parasitadas (inferior) em parcelas pulverizadas com 1, 2, 3 e 4 aplicações de *B. spodoptera* ou aplicação única de inseticida durante quatro semanas em Sete Lagoas, MG

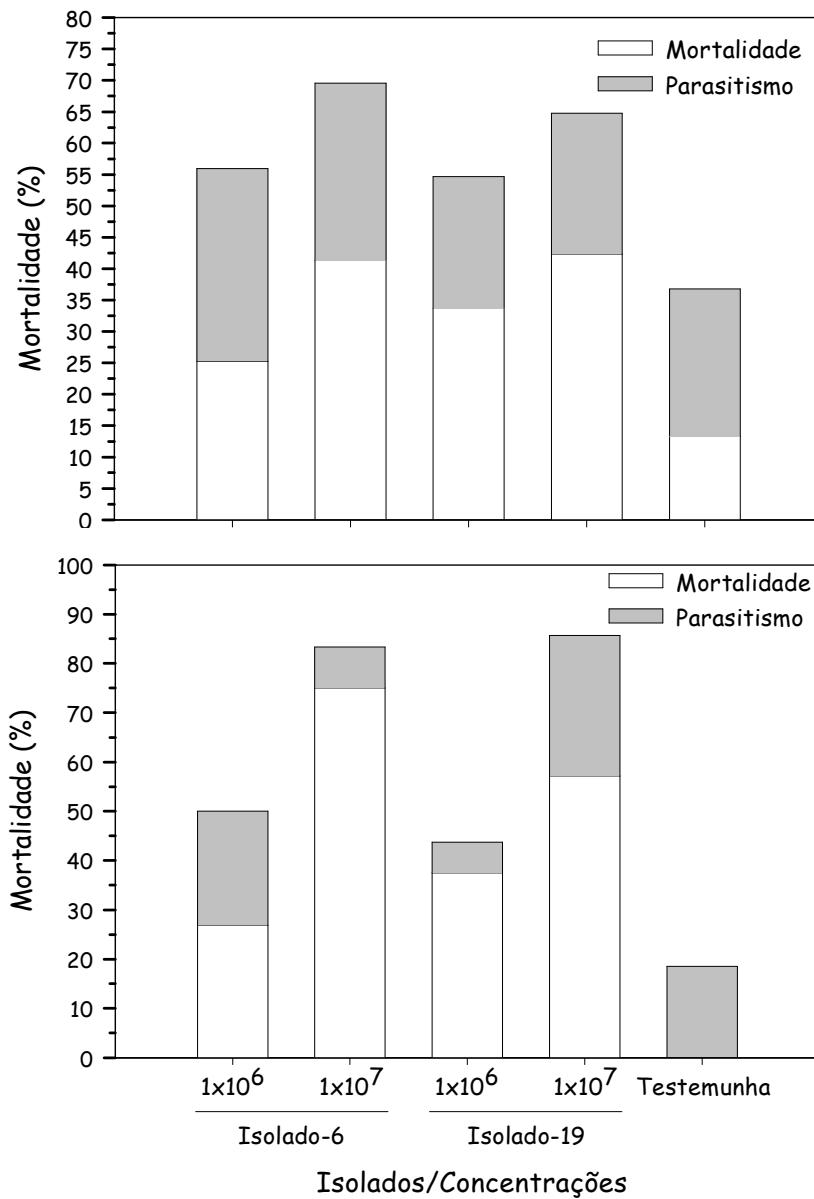


Figura 5 – Mortalidade por baculovírus e parasitismo da lagarta do cartucho em plantas de milho pulverizadas com *B. spadoptera* em duas concentrações e isolados no município de Sete Lagoas (superior) e Janaúba (inferior), MG.

O *B. spodoptera* também já se mostrou eficiente no controle da lagarta do cartucho utilizando água de irrigação com aspersor setorial. A tabela 1 mostra a mortalidade da lagarta do cartucho pulverizada com baculovírus em uma formulação líquida, a mortalidade de larvas causada pela presença de parasitóides e a soma das mortalidades destas larvas. Como pode ser observado, a mortalidade causada por parasitóides nos 3 tratamentos com o baculovirus variou de 25,9 a 31,7% e mortalidade total foi superior a 80%. Com a aplicação de baculovírus em uma formulação pó molhável em uma única lâmina de água (Tabela 2) o percentual de parasitismo foi intenso variando de 37,1 a 53,5% e a mortalidade total variou de 82,2 a 93,8%

Tabela 1 – Mortalidade de *Spodoptera frugiperda* por *B. spodoptera*, em uma formulação líquida, aplicada via água de irrigação e larvas mortas por parasitóides

Lâmina de água (mm)	Dosagem (PIBs/mL)	Mortalidade larval (%)	Parasitismo (%)	Total de Controle (%)
3	$3,0 \times 10^{12}$	56,0 a	27,8 b	82,7 a
5	$3,0 \times 10^{13}$	58,9 a	25,9 b	84,8 a
7	$2,8 \times 10^{12}$	53,8 a	31,7 b	85,5 a
Testemunha (6mm)	Água	0,0 b	58,7 a	58,3 b

Tabela 2 – Mortalidade de *Spodoptera frugiperda* por *B. spodoptera*, em uma formulação pó molhável, aplicada via água de irrigação e larvas mortas por parasitóides.

Lâmina de água (mm)	Dosagem (PIBs/mL)	Mortalidade larval (%)	Parasitismo (%)	Total de Controle (%)
6	$2,0 \times 10^{11}$	28,7 b	53,5 a	82,2 ab
6	$1,0 \times 10^{12}$	43,4 a	52,2 a	95,6 a
6	$2,0 \times 10^{12}$	56,7 a	37,1 b	93,8 a
Testemunha (6mm)	Água	9,7 c	62,7 a	72,4 b

2.4. ESTABILIDADE DE *B. spodoptera* FORMULADO EM PÓ MOLHÁVEL

As condições de armazenamento poderão afetar a infectividade do baculovírus. Assim o tempo de prateleira de um produto biológico deve ser determinado a fim de que possa ser utilizado com segurança, obtendo-se a eficiência de controle desejada. Foi verificada a eficiência do baculovírus com a utilização de dois materiais inertes distintos: caolin e zeólita. Após um ano de armazenamento foi observado que não houve diminuição da eficiência de controle de lagartas de *S. frugiperda*, não havendo diferença significativa entre os tempos de avaliação ou materiais inertes utilizados na formulação (Fig. 6). Observou-se, na média, maior eficiência na concentração de 4×10^7 PIBs/mL (89,7%) do que na de 4×10^6 PIBs/mL (98,7%).

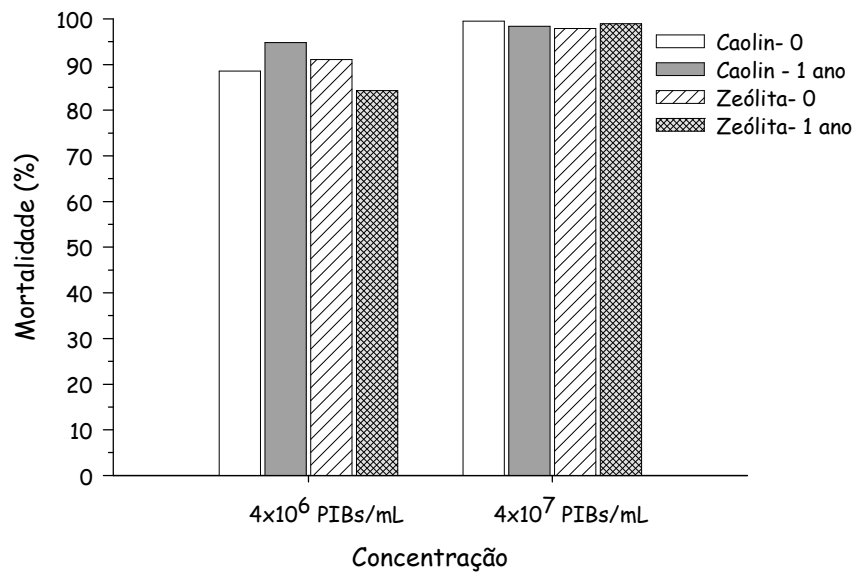


Figura 6 – Mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* inoculadas com *B. spodoptera* formulado em pó molhável, em dois tipos de material inerte, mantido em condições de armazenamento durante 1 ano.

3. PRODUÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* PARA O CONTROLE DA LAGARTA DO CARTUCHO

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. Estas proteínas, chamadas de δ endotoxinas, formam estes cristais (Fig. 7) que 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 destas proteínas são restritas 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. 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.

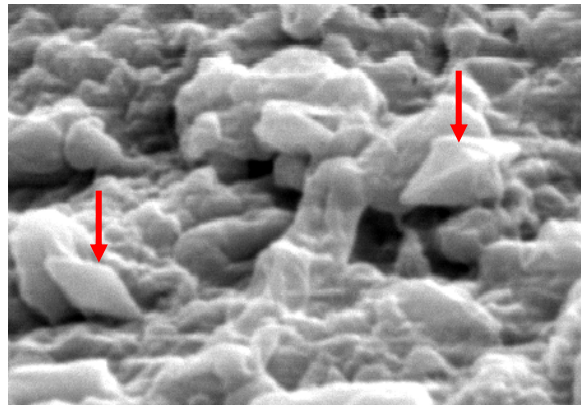


Figura 7 – Cristal de forma bipiramidal da cepa 344 de *Bacillus thuringiensis* (Valicente & Souza, 2005).

O *Bt* pode ser tornar uma alternativa viável e econômica para controle desta praga, evitando a contaminação do meio ambiente, de aplicadores e morte de inimigos naturais. Este agente de controle biológico pode ser cultivado em meio sólido, líquido e semi-sólido. O uso de água de milho, vinhaça, glucose de milho,

arroz, água de beterraba, fubá, farinha e/ou farelo de soja é uma alternativa viável e econômica na utilização de subprodutos para produção deste patógeno.

3.1. PRODUÇÃO DE BIOPESTICIDA A BASE DE *B. thuringiensis*:

O *B. thuringiensis* necessita para o seu crescimento de fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais. Vários experimentos foram realizados testando diversas fontes de C e N. Um dos métodos para cultivo do Bt é através do uso do arroz como substrato para o seu crescimento. A cepa de Bt que se deseja multiplicar deve ser crescida em meio líquido (inóculo semente), sob agitação constante a 30°C. O arroz a ser inoculado pode ser enriquecido com fontes de C e N, autoclavado e esterilizado e, inoculado com o inóculo semente. O arroz inoculado com Bt deve ser armazenado a 30°C por 4 dias.

Vários bioensaios foram realizados com o objetivo de viabilizar o uso de um biopesticida a base de Bt para o controle da lagarta do cartucho. Nestes bioensaios foram usadas duas fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais. Os resultados destes bioensaios mostraram que é possível produzir um biopesticida a base de Bt, a preços muito reduzidos e o produto final chega a matar 100% das larvas testadas. Experimentos de campo também mostraram a eficiência deste biopesticida em fazendas de milho na região do sul de Goiás.

A quantidade de carbono e nitrogênio usado para produzir biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) pode influenciar a qualidade final do produto. O objetivo deste trabalho foi testar meios com diferentes níveis de carbono e nitrogênio: meio 1 - glucose de milho a 1.5% + farinha de soja a 0,5%, meio 2 - glucose de milho a 3.0% + farinha de soja a 1.0%, meio 3 - glucose de milho a 1.0% + farinha de soja a 3.0% e meio 4- comercial Luria Bertani (LB) + sais (FeSO₄, ZnSO₄, MnSO₄ e MgSO₄). O inóculo semente foi produzido usando 150mL de meio LB mais sais, incubados por 18 horas a 30°C, sob agitação de 200rpm. A cepa utilizada foi a 344 (*B. thuringiensis* var *tolworthi* – pertencente ao Banco de Microorganismos da Embrapa). O pH foi medido a intervalos regulares, os esporos viáveis foram expressos em c.f.u/mL, massa celular em g/L- liofilizado, e a contagem do

número de esporos por mL de meio. Os resultados mostraram que após 96 horas o pH de todos os meios testados tenderam ao básico (entre 6,91 e 8,15), o maior número de esporos foi de 4.39×10^9 esporos/mL no meio 3, sendo que neste meio o teor de proteína usado foi a mais alta. A maior produção de massa celular foi observada no meio 3, com um total acumulado de 39,3 g/L. A mortalidade atingiu 100% de larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) de 2 dias de idade nos meios 3 e 4 com 100%. A CL_{50} para o meio 3 foi de $8,4 \times 10^6$ esporos/mL. Os meios alternativos usados promoveram o crescimento satisfatório do *Bt*, sendo que o meio 3 foi o mais promissor para ser usado na produção de biopesticida a base de *Bt*.

Há várias informações que podem ser úteis num sistema de produção de um biopesticida a base de *Bt*. Estas podem ser encontradas no site:

http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2005/circular/Circ_60.pdf

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De um modo geral os biopesticidas promovem um controle satisfatório da lagarta do cartucho a campo, desde que aplicados de acordo com as especificações de cada produto. Seguir as seguintes normas:

- 1) O bioinseticida deve ser armazenado em local fresco e seco, sem luz, para uma melhor conservação da qualidade do produto.
- 2) A primeira pulverização deve ser realizada assim que forem observados os primeiros sinais de folhas raspadas, que pode ocorrer entre os 5 e 15 dias após a germinação.
- 3) Faça o monitoramento correto, pois a 1ª aplicação é fundamental, quanto menor estiver a lagarta, maiores serão as chances de controle.
- 4) As pulverizações devem ser executadas após as 16:00 h, devido a menor incidência de raios ultravioletas
- 5) A vazão pode ser adequada de acordo com a tecnologia do produtor, entretanto certifique-se de toda a cultura foi bem pulverizada principalmente o cartucho da planta de milho.
- 6) Deve-se usar espalhante adesivo, pois este otimiza a persistência do produto na planta.

5. LITERATURA CONSULTADA

Hunter-Fujita, R. R.; P. F. Entwistle; H. F. Evans & N. E. Crook. 1998. Insect Viruses and Pest Management, Wiley, Chichester.

Miller, I. K. 1986. The genetics of baculoviruses. In: Granados, R.R. & B.A. Federici (eds). The Biology of Baculoviruses, CRC Press, Florida, p. 217-238.

Valicente, F.H. & I. Cruz. 1991. Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus. Sete Lagoas, Embrapa-CNPMS. 23p. (Circular técnica, n. 15).

Valicente, F.H. & E.F. da Costa. 1995. Controle da lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) com *Baculovirus spodoptera*, aplicado via água de irrigação. Ann. Soc. Entomol. do Brasil 24: 61-67.