



EFEITO DO SOBRENADANTE DE CULTURAS BACTERIANAS ISOLADAS DE *AZADIRACHTA INDICA* NA BIOLOGIA DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA*

Anaiara dos Santos, Herika Dayane da Silva, Teresinha Augusta Giustolin, Adelica aparecida Xavier, Clarice Diniz Alvarenga

Introdução

Spodoptera frugiperda destaca-se no Brasil como praga chave da cultura do milho, ocorrendo em todas as regiões produtoras (FIGUEREDO *et al.* [1]). Os prejuízos causados por essa praga dependem do estágio de desenvolvimento da planta e da ocasião em que ocorrer o ataque. Por exemplo, em plantas com 30 dias de idade os prejuízos são da ordem de 15% e, naquelas em fase de florescimento podem chegar a 34% (BARROS [2]).

O controle de *S. frugiperda* tem sido feito por meio de inseticidas químicos que, apesar de eficientes tem aumentado os custos de produção e a poluição ambiental, deixando resíduos nos alimentos. Uma forma de contornar esses problemas pode ser feita por meio do uso de microrganismos entomopatogênicos que tem os fungos e as bactérias como os agentes de controle mais utilizados. Esses microrganismos já foram isolados em diversos habitats, inclusive da superfície e/ou interior de plantas.

Kusari *et al.* [3] isolaram de *Azadirachta indica* A. Juss, nim, (Meliaceae), espécie considerada uma das mais promissoras e estudadas para o controle de insetos, o fungo endofítico *Eupenicillium parvum* (Raper e Fennell), que produziu em seu meio artificial de crescimento as substâncias azadiractina A e B. Cardoso [4] trabalhando com nim isolou bactérias endofíticas, epifíticas e obtidas do extrato fermentado das folhas. Essas bactérias foram avaliadas por Soares [5] sobre as lagartas de *S. frugiperda*. O autor observou que a ingestão dessas bactérias provocou no inseto um aumento na duração e mortalidade larval e pupal, redução nos pesos das pupas machos e fêmeas, aumento na deformação de adultos e redução na porcentagem de adultos viáveis.

O potencial inseticida de *A. indica* tem sido relacionado aos metabólitos secundários produzidos por essa planta, que possui como principal ingrediente ativo um tetranortriterpenóide limonóide, azadiractina, que é biologicamente ativo e, predominantemente encontrado nas sementes do nim, cascas, folhas e frutos. A azadiractina afeta o comportamento e a fisiologia dos insetos, além da reprodução (MORDUE (LUNTZ) e NISBET [6]). Além da azadiractina, o nim apresenta outros 20 compostos que já foram identificados (BEVILACQUA *et al.* [7]).

A eficiência no controle de insetos observada para *A. indica* pode estar relacionada aos metabólitos secundários produzidos por ela, mas também, pela presença dos microrganismos associados (RADU e CHEAH [8]). Estes organismos, fungos e/ou bactérias, estão associados na forma endofítica e/ou epifítica e podem ser os responsáveis pela produção de substâncias tóxicas que possuem atividade inseticida. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do sobrenadante de culturas bacteriana isoladas de folhas de nim a *S. frugiperda*.

Material e métodos

O ensaio foi realizado nos laboratórios de Entomologia e Fitopatologia da Universidade Estadual de Montes Claros, UNIMONTES, Campus de Janaúba. As lagartas de *S. frugiperda* foram criadas em laboratório em dieta artificial (GRENNE *et al.* [9]). As bactérias utilizadas no ensaio estão armazenadas na bacterioteca do Laboratório de Fitopatologia, mantida sob condições ambientais de laboratório, em água mineral esterilizada. Essas bactérias foram isoladas de folhas de *A. indica*, a partir de extratos fermentados de nim (Nim) e da superfície das folhas (epifítica - Epi).

Os isolados bacterianos avaliados foram o Epi 01, Epi 09, Epi 12, Nim 05, Nim 08 e Nim 10. Estes isolados foram multiplicados em meio T.S.A (Tryptic Soy Agar), previamente esterilizado em autoclave a 120 °C, durante 20 minutos. A repicagem foi feita a partir da transferência de uma pequena alíquota (bactéria + água mineral), utilizando uma alça de platina. As placas contendo as bactérias foram incubadas sob condições de laboratório, por 48 horas. As suspensões bacterianas foram preparadas a partir da adição de 3,0 mL de uma solução de NaCl (0,85 %) estéril em cada placa de Petri que continha as colônias bacterianas multiplicadas. As colônias de cada um dos isolados foram raspadas com o auxílio de uma alça de Drigalski e as suspensões obtidas colocadas em tubos plásticos de centrífuga, para serem centrifugadas por 15 minutos em rotação de 10.000 rpm. Transcorrido esse período, os tubos foram retirados da centrífuga e o sobrenadante transferido para um novo tubo, separadamente por isolado bacteriano. O sobrenadante foi levado para câmara de fluxo laminar e utilizado no ensaio.



Os sobrenadantes bacterianos foram utilizados para emergir fragmentos de folhas de milho (2,0 cm x 2,0 cm) que foram oferecidos as lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda*. As plantas de milho foram cultivadas na área Experimental da UNIMONTES, Campus de Janaúba, MG. Antes de serem cortadas, as folhas de milho foram lavadas, deixadas para secar a água da lavagem e, então cortadas em fragmentos. Até o momento de serem utilizados, os frascos contendo os sobrenadantes permaneceram sob constante agitação, em agitador magnético. Os fragmentos de folhas foram imersos no sobrenadante durante 20 segundos. Após a imersão, os fragmentos foram dispostos sobre uma mesa forrada com papel toalha para evaporação do excesso de umidade. Os discos tratados foram transferidos para tubos de vidro (2,5 cm x 8,5 cm) esterilizados e tampados com algodão higrógrafo que continha em seu fundo uma fina camada de ágar-água, visando a manutenção da umidade do fragmento de folha. Sobre o fragmento de folha foi transferida uma lagarta recém-eclodida de *S. frugiperda*. As folhas de milho do controle foram imersas em água destilada. O fragmento de folha tratado permaneceu 72 horas, servindo de alimento para as lagartas, inclusive os do controle, quando então foram substituídos por fragmentos não tratados. A partir desta troca, as novas folhas foram oferecidas as lagartas somente quando necessário e, este procedimento durou até a pupação.

O experimento foi realizado em DIC e constou de seis tratamentos (sobrenadantes dos isolados) e um controle (folha imersa em água). Cada tratamento foi constituído por 50 repetições composta por uma lagarta recém-eclodida de *S. frugiperda*.

Foram avaliadas a mortalidade larval e pupal, duração larval e pupal, peso de pupas macho e fêmea, obtido 24 horas após a pupação, deformação de pupas e adultos e adultos inviáveis. Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias de mortalidade larval e pupal, deformação de pupas e adultos foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis, programa estatístico Past. Os resultados de duração larval e pupal e peso de pupas foram comparados pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar, versão 5.3 (FERREIRA [10]).

Resultados

A ingestão de folha de milho tratada com o sobrenadante bacteriano pelas lagartas de *S. frugiperda* afetou significativamente a sobrevivência e desenvolvimento deste inseto (Tabela 1). A sobrevivência do inseto foi afetada pela significativa mortalidade das lagartas que foi maior quando ingeriram folhas tratadas com os sobrenadantes do que no controle, a exceção da ingestão do sobrenadante do isolado Nim 05, que foi semelhante ao controle. Os tratamentos Epi 01 e Epi 12 foram os que provocaram as maiores mortalidades das lagartas (38,0% e 34,0%, respectivamente), que foram maiores que as observadas no controle, tratamentos Nim 05 e Nim 10. Os sobrenadantes dos isolados Epi 09 e Nim 08 provocaram valores de mortalidades intermediários (26,5% e 22,4%, respectivamente) que estiveram seus valores entre os tratamentos Epi 01 e Epi 12 e os tratamentos Nim 05 e Nim 10. A ingestão de folhas tratadas pelas lagartas não afetou a sobrevivência das pupas deste inseto. A mortalidade das pupas foi baixa e semelhante ao controle.

A duração larval de *S. frugiperda* não foi afetada pela ingestão das folhas tratadas, resultando em valores semelhantes aos obtidos no controle (Tabela 1). O mesmo não foi constatado para a duração pupal que foi afetada pela ingestão pelas lagartas de folhas tratadas. O efeito significativo observado sobre a duração pupal foi o de redução, no qual as lagartas alimentadas com folhas tratadas com o isolado Epi 01 levaram em média menor tempo para a emergir adultos.

O peso das pupas machos, mas não os de fêmeas, foi afetado significativamente pela ingestão de folhas tratadas pelas lagartas (Tabela 1). Somente o sobrenadante do isolado Epi 12 causou redução no peso das pupas macho (18,0%), que foi maior que no controle e isolado Nim 08. Nos demais tratamentos as pupas apresentaram pesos com valores intermediários ao isolado Epi 12 e controle.

A ingestão pelas lagartas de folhas tratadas provocou significativa deformação nos adultos de *S. frugiperda*, mas não nas pupas (Tabela 1). Somente a ingestão dos sobrenadantes dos isolados Nim 05 e Nim 10 provocaram deformações nos adultos (14,6% e 15,8%, respectivamente), valores que foram superiores ao controle. Nos demais tratamentos as deformações nos adultos tiveram valores intermediários entre os isolados Nim 05 e Nim 10 e o controle. A porcentagem de adultos viáveis foi afetada pela ingestão pelas lagartas de folhas tratadas, sendo que, os isolados Epi 1 e Epi 12 foram os que causaram as maiores reduções.

Discussão

Os sobrenadantes dos isolados bacterianos avaliados neste trabalho se mostraram tóxicos as lagartas de *S. frugiperda* (Tabela 1). A ingestão destes metabólitos pelas lagartas causou a morte, alongou a duração das pupas e reduziu o peso das fêmeas, como também, deformou os adultos. Soares [5] também avaliaram os sobrenadantes destes mesmos isolados, mas associados as células bacterianas e, também verificaram estes fatos.



Neste ensaio foi constatada a redução no peso das pupas fêmeas (Tabela 1). Esta é uma ocorrência interessante, pois esta redução pode levar a emergência de adultos de menores tamanhos, menos fecundos e férteis, podendo até influenciar na longevidade dos mesmos. Soares [5] verificou que os isolados bacterianos Epi 09, Epi 12 e Nim 05, provocaram reduções nos pesos das pupas macho.

Neste ensaio foi constatada também a ocorrência de deformação nos adultos de *S. frugiperda* após a ingestão pelas lagartas de folhas tratadas (Tabela 1). Este é um fator importante de ser observado, pois pode reduzir o número de adultos viáveis na população. Os adultos deformados, na maioria das vezes, são incapazes de se reproduzir. Soares [5] verificou que os isolados Epi 01, Nim 08 e Nim 10 provocaram deformações nos adultos que foram da ordem de 17,0% a 31,0%. Este mesmo autor também constatou que os isolados Epi 01 e Epi 12 foram os que causaram as maiores reduções no número de adultos viáveis, diferindo da testemunha.

Neste trabalho foram avaliados os sobrenadantes de seis isolados bacterianos que se mostraram tóxicos a *S. frugiperda*. Apesar dos resultados não terem sido expressivos do ponto de vista prático permitiram comprovar que os metabólitos produzidos por esses microrganismos, não são induzidos a serem produzidos devido a presença do inseto-praga, mas afetam o desenvolvimento deste inseto. A compreensão deste efeito pode direcionar as buscas de novos mecanismos envolvidos nos screening de isolados microbianos. Além disso, a interpretação do efeito dos extratos de plantas inseticida sobre os insetos deve ser realizado com cautela, pois, é possível que esse efeito esteja relacionado a uma carga microbiana associada a planta, bem com, aos efeitos indiretos destes metabólitos microbianos.

Conclusão

Os sobrenadantes das culturas bacterianas isoladas de *A. indica* avaliados são tóxicos as lagartas de *S. frugiperda*.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado, à FAPEMIG, pelas bolsas de Incentivo à Pesquisa e Iniciação Científica e ao CNPq, pela bolsa de Incentivo à Pesquisa.

Referências

- FIGUEIREDO, M. L. C.; PENTEADO-DIAS, A. M.; CRUZ, I. Efeito do inseticida chlorpyrifos e sua interação com inimigos naturais na supressão de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 5, n. 3, p. 325-339, 2006.
- BARROS, R. **Pragas do milho**. Tecnologia e produção: soja e milho 2011/2012. Disponível em: http://www.fundacaoms.org.br/uploads/publicacoes/14%20-%20pragas%20do%20milho_274738388.pdf. Acesso em: 20/03/2014.
- KUSARI, S. et al. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. *World journal of microbiology and biotechnology*, v. 28, n.3, p. 1287-1294, 2012.
- CARDOSO, A. M. S. Caracterização fisiológica de isolados bacterianos obtidos de *Azadirachta indica* e de bananeira 'prata anã'. 2012. **Monografia** (Trabalho de conclusão de curso) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2012.
- SOARES, E. P. S. **Patogenicidade de bactérias isoladas de nim à *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**. 2013. 66p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido), Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2013.
- MORDUE, A. J.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Anais da Sociedade Entomológica Brasileira*. v.29, p.615-632, 2000.
- BEVILACQUA, A. H. V.; SUFFREDINI, I. B.; BERNARDI, M. M. Toxicidade de Neem, *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), em *Artemia* sp: comparação da preparação comercial e do óleo puro. *Revista do Instituto de Ciências da Saúde*, São Paulo, v. 26, n. 2, p.157-160, 2008.
- RADU, S.; YOKE, C. Preliminary screening of endophytic fungi from medicinal plants in Malaysia for antimicrobial and antitumor activity. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, v. 9, n. 2, p. 23-33, 2002.
- GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, v.69, n.4, p.488-497, 1976.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR**: Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA, 2010.

Tabela 1. Duração e mortalidade larval e pupal, peso de pupas macho e fêmea, deformação de pupas e adultos e adultos inviáveis de *Spodoptera frugiperda* alimentadas, quando recém-eclodidas, com folhas de milho tratadas com os sobrenadantes obtidos da centrifugação de suspensões de bactérias isoladas de plantas de nim, *Azadirachta indica*.

Trat.	Larvas		Pupas				Adultos		
	Duração (dias) ¹	Mortalidade (%) ²	Duração (dias) ¹	Mortalidade (%) ²	Peso (mg) ¹		Def. (%) ²	Def. (%) ²	Inviáveis (%) ¹
					Machos	Fêmeas			
Controle	16,9 a	6,1c	9,4 b	0,0 a	188,1 b	181,8 a	0,0 a	2,2 b	10,0 a
Epi 01	17,5 a	38,0 a	8,3a	6,5 a	174,9 ab	180,5 a	0,0 a	6,9ab	42,0 b
Epi 09	17,1 a	26,5ab	8,4 ab	2,8 a	172,7 ab	175,7 a	0,0 a	11,4ab	36,0 ab
Epi 12	17,7 a	34,0 a	9,4 b	3,0 a	153,8 a	164,7 a	3,0 a	6,3ab	38,0 b
Nim 05	17,2 a	14,3bc	8,7 ab	2,4 a	178,9 ab	164,1 a	2,4 a	14,6 a	28,0 ab
Nim 08	17,9 a	22,4ab	8,7 ab	7,9 a	189,1 b	186,3 a	0,0 a	11,8ab	32,0 ab
Nim 10	17,6 a	20,0b	9,3 ab	5,1 a	182,3 ab	166,9 a	2,6 a	15,8 a	32,0 ab
CV	10,26	-	18,91	-	16,32	15,34	-	-	-



FEPEG | FÓRUM DE ENSINO,
PESQUISA, EXTENSÃO
E GESTÃO

TRABALHOS CIENTÍFICOS APRESENTAÇÕES ARTÍSTICAS E CULTURAIS DEBATES MINICURSOS E PALESTRAS

23 A 26 SETEMBRO DE 2015
Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

ISSN 1806-549X

A HUMANIZAÇÃO NA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



¹ Medias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

² Medias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.