


Bactérias endofíticas no controle biológico de *Spodoptera frugiperda*

 <https://doi.org/10.56238/sevened2024.004-008>

Irisléia Pereira Soares de Sousa

Doutoranda em Produção Vegetal;
Universidade Estadual de Montes Claros,
UNIMONTES,
E-mail: pereira.irisleia@yahoo.com.br

Martielle Batista Fernandes

Doutora em Produção Vegetal;

Michelle de Oliveira Santos

Graduanda em Engenharia Agrônômica;

Amanda Dayanne Malta Matos

Doutoranda em Produção Vegetal;

Sabrina Gonçalves Vieira de Castro

Mestranda em Produção Vegetal;

Luciele Barboza de Almeida

Mestre em Produção Vegetal;

Marielly Maria Almeida Moura

Doutoranda em Produção Vegetal;

Helena Souza Nascimento Santos

Doutoranda em Produção Vegetal;

Jaqueline Pereira Medeiros da Silva

Mestranda em Produção Vegetal;

Edson Hiydu Mizobutsi

Doutor em Fitopatologia.

RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar patogenicidade de bactérias isoladas do nim, *Azadirachta indica*, sobre os adultos de *Spodoptera frugiperda*. Todas as suspensões bacterianas avaliadas foram calibradas para a concentração de $5,0 \times 10^8$ células/mL. Os adultos avaliados foram os sobreviventes de lagartas que ingeriram folhas de milho tratadas com as suspensões bacterianas. Com esses adultos sobreviventes foram constituídos casais, que foram mantidos em gaiolas. Foram avaliadas a longevidade de machos e fêmeas, o período de pré-oviposição e fértil, o número total de posturas, a fecundidade e fertilidade das fêmeas. Do total de isolados avaliados, 64,0% deles causaram algum efeito adverso aos adultos, a ponto de afetarem uma ou mais das variáveis avaliadas. A ingestão das bactérias pelas lagartas reduziu a longevidade de adultos, macho e fêmea. As fêmeas tiveram redução no período fértil, no número de posturas, na fecundidade e na fertilidade. Somente o período de pré-oviposição não foi afetado. Os isolados *Bacillus* sp. Epi 9, *Bacillus subtilis* e Nim 10 são destaque pois afetam o maior número de variáveis avaliadas. Os resultados obtidos neste trabalho são promissores e importantes, pois este é o primeiro relato de bactérias isoladas de nim com ação patogênica a *S. frugiperda*.

Palavras-chave: *Azadirachta indica*, Controle biológico, Lagarta do cartucho-do-milho.

1 INTRODUÇÃO

As espécies vegetais estão associadas simbioticamente a uma extensa e diversa comunidade de microrganismos, dentre eles, as bactérias e os fungos (HARDOIM et al., 2015; VERMA et al., 2009). Esses microrganismos endofíticos não causam sintomas de doença em seus hospedeiros, mas vivem de forma simbiótica com a planta (WILSON, 1995).

Uma das espécies vegetais mais estudada quanto a sua microbiota é *Azadirachta indica*, nim, devido a sua importância como planta medicinal, já que é utilizada por cerca de 80,0% das nações em desenvolvimento (EID et al., 2017; CHUTULO & CHALANNAVAR, 2018), além da sua importância como planta inseticida (VERMA et al., 2011). Todas as partes desta planta já foram avaliadas para uso no controle de insetos e todas elas se mostraram nocivas às pragas. Já foi verificado que o nim tem sobre os insetos efeito anti-alimentar, de repelência a oviposição e de inibição de outras atividades biológicas e fisiológicas desses organismos. Além dessas interferências, o nim pode reduzir o crescimento dos insetos, inibir a ecdise e a reprodução, além de causar a sua morte (ROEL, 2010; COSTA et al., 2004). A azadiractina, o principal composto presente no nim, afeta a troca de exoesqueleto e o crescimento do inseto, pois se assemelha ao hormônio da ecdise, por esse motivo (ANURADHA et al., 2007; MARTINEZ, 2011).

Em *A. indica*, além dos metabólitos secundários, já foram isolados, caracterizados e identificados fungos e bactérias associadas de forma simbiótica a esta planta (VERMA et al., 2007; VERMA et al., 2009; VERMA et al., 2011; CARDOSO, 2012; KUSARI et al., 2012; SINGH et al., 2017; D'LUIS et al., 2017). Esses microrganismos endofíticos são responsáveis pela biossíntese parcial ou completa dos metabólitos secundários das suas plantas hospedeiras (RAJAGOPAL et al., 2012; LUDWIG-MÜLLER, 2015). Exemplo desse fato foi constatado com o fungo endofítico, *Eupenicillium parvum*, que foi isolado da planta nim. Segundo os autores, no filtrado de seu meio artificial de crescimento foram identificadas as substâncias azadiractina A e B (KUSARI et al., 2012). O fungo *Nigrospora* sp., também endofítico do nim, produziu em seu meio de crescimento solanapyrones N, O e C, substâncias análogas aquelas produzidas na planta (WU et al., 2009).

Dentre os grupos de microrganismos mais citados na literatura e que já foram isolados da planta nim encontram-se os fungos (VERMA et al., 2007; VERMA et al., 2011), os actinomicetos (VERMA et al., 2009; VERMA et al., 2011) e as bactérias (D'LUIS et al., 2017).

Cardoso (2012) isolou 33 bactérias associadas a planta nim, dentre elas 16 já foram identificadas, o *Bacillus pumilus* (7), *Bacillus methylophilus* (1), *Bacillus licheniformis* (2), *Bacillus subtilis* (2) e *Bacillus amyloliquefaciens* (1), além de duas outras pertencentes ao gênero *Bacillus* sp. e uma ao gênero *Methylobacterium* sp. Este autor constatou que alguns desses isolados possuem potencial para a produção de ácido indol-3-acético (AIA). Soares (2013) avaliou os 33 isolados de Cardoso (2012), quanto a patogenicidade e virulência as lagartas de *S. frugiperda*. O autor verificou

que, quando lagartas com 10 dias de idade ingeriram folhas de milho tratadas com as suspensões bacterianas causou aumento na duração e mortalidade das fases larval e pupal, redução no peso de pupas macho e fêmea e aumento na deformação de adultos, o que reduziu o número de adultos viáveis na população.

Os resultados obtidos por Soares (2013) demonstram o grande potencial que possui essas bactérias isoladas de *A. indica*, para o controle de *S. frugiperda*. Esse autor comprovou a ação patogênica desses microrganismos na sobrevivência e no desenvolvimento da lagarta-do-cartucho, o que possibilitou a seleção daquelas bactérias mais virulentas a *S. frugiperda*. Essas bactérias mais virulentas reduziram o número de adultos de *S. frugiperda* viáveis, que seriam incorporados a população. Apesar da reconhecida importância dos resultados obtidos por este autor, ele não avaliou o desempenho dos adultos sobreviventes. No presente trabalho esses adultos foram avaliados, pois postula-se que, a ingestão pelas lagartas dos isolados bacterianos afeta negativamente a fecundidade e fertilidade dos adultos. Assim, embasados nos resultados obtidos por Soares (2013), este trabalho teve por objetivo avaliar a fecundidade e a fertilidade de adultos de *S. frugiperda* após as lagartas ingerirem folhas de milho tratadas com as bactérias isoladas de *A. indica*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em laboratórios, sob condições controladas (temp.: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, U.R.: $60\pm 10\%$ e fotofase: 12 h), utilizando lagartas recém-eclodidas de *Spodoptera frugiperda* retiradas da criação-estoque, onde eram alimentadas com dieta artificial (GREENE *et al.*, 1976). Os adultos foram alimentados com solução de mel a 10,0%.

Os isolados bacterianos avaliados foram: Epi 1, Epi 7 (*Bacillus pumilus* - E value de 0,0, identidade de 99,0% e número de acesso ao Genbank - KR010188.1), Epi 9 (*Bacillus* sp. - E value de $3.e^{-50}$, identidade de 95,0%, número de acesso ao Genbank - KM678261.1), Epi 12, Epi 13 (*Bacillus* sp. - E value de $3.e^{-55}$, identidade de 97,0%, número de acesso ao Genbank - JN700129.1), Nim 5 (*Bacillus methylotrophicus* - E value de 0,0, identidade de 99,0%, número de acesso ao Genbank - KM659219.1), Nim 8 (*Bacillus subtilis* - E value de 0,0, identidade de 98,0%, número de acesso ao Genbank - KF818630.1), Nim 10, Nim 12, Nim 14 e Nim 15 (*Bacillus pumilus* - E value de 0,0, identidade de 99,0%, número de acesso ao Genbank - KR010188.1). Estes isolados foram obtidos junto à Bacterioteca do Laboratório de Fitopatologia da UNIMONTES, Campus de Janaúba, MG, onde estão armazenados em água mineral esterilizada e mantidos em condições controladas (temp.: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, U.R.: $60\pm 10\%$ e fotofase: 14 h). Essas bactérias foram isoladas da superfície (epifítica - Epi) e do extrato fermentado (Nim) de folhas de *Azadirachta indica* (CARDOSO, 2012).

2.1 CULTIVO DAS PLANTAS DE MILHO

Sementes de milho crioulo, suscetível a *S. frugiperda*, foram semeadas em vasos plásticos (3,0 dm³). As plantas foram mantidas sob condições de telado. Durante o período de cultivo as plantas não receberam nenhum tratamento fitossanitário para o controle de pragas. Folhas da região do cartucho de plantas, com 15 dias após a germinação, foram utilizadas na alimentação de lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda*, visando à realização do ensaio com os insetos adultos da praga.

2.2 MULTIPLICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Para a multiplicação dos isolados bacterianos foi utilizado o meio de cultura sólido TSA (Tryptic Soy Agar) (40 g em 1.000 mL água destilada). O meio foi esterilizado em autoclave, regulada para 120°C/1,0 atm, durante 20 minutos. Os isolados bacterianos foram multiplicados em placas de Petri (90 mm x 15 mm) a partir da transferência de uma alíquota (1,0 mL) obtida da suspensão de armazenamento. Os isolados foram incubados em temperatura ambiente por 24 horas.

Para obtenção da suspensão bacteriana, sobre as colônias bacterianas incubadas foi adicionado 5,0 mL de solução salina (NaCl a 0,85%) estéril. As células bacterianas foram desagregadas, usando uma lâmina de vidro de microscópio esterilizada e, então, transferidas para tubos de ensaio (2,5 cm x 15 cm), para homogeneização em aparelho Vortex. Em espectrofotômetro ajustado para 540 nm de densidade óptica, a absorbância das suspensões bacterianas de cada um dos isolados foi ajustada, de modo que, a concentração atingisse $5,0 \times 10^8$ células/mL. Os ajustes das absorbâncias foram embasados nas curvas de crescimento destes isolados bacterianos estabelecidas por Silva (2014). Para o ajuste da concentração das suspensões bacterianas foi adicionado NaCl (0,85 %) estéril.

2.3 OBTENÇÃO DE PUPAS DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA*

Folhas retiradas da região central do cartucho de plantas de milho foram cortadas em fragmentos (5,0 cm x 5,0 cm) que foram imersos, durante 20 segundos, nas suspensões bacterianas. Esse procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. Como controle do experimento, os fragmentos foram imersos em água destilada esterilizada. Os fragmentos tratados e não tratados foram dispostos sobre papel filtro, para ocorrer à perda do excesso de umidade.

Em recipientes plásticos transparentes (250 mL), contendo em seu fundo uma fina camada de meio ágar-ágar esterilizado foram distribuídos cinco fragmentos de folhas de milho tratados ou não tratados, dependendo do tratamento ou controle a ser avaliado. O ágar-ágar foi utilizado para evitar que as folhas de milho enrolassem e, também, para manter a turgidez das mesmas. Para cada tratamento (isolados e controle) foram preparados três desses recipientes. Em cada um dos recipientes, sobre as folhas de milho foram transferidas, aproximadamente, 200 lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda*, que foram fechados com as tampas. As lagartas ficaram se alimentando dessas folhas por três dias,

quando então, o alimento foi substituído por outras não tratadas. As lagartas permaneceram se alimentando das folhas não tratadas por mais cinco dias, quando então foram individualizadas em tubos de vidro com fundo chato (2,5 cm x 8,5 cm), também contendo uma fina camada ágar-água em seu fundo e um fragmento de folha de milho inserido, conforme descrito anteriormente. Nos tubos, as lagartas foram alimentadas até a pupação. A troca de alimento nesta etapa do experimento foi realizada sempre que necessário. As lagartas do controle foram criadas em milho não tratado, durante todo o período larval.

As pupas obtidas foram retiradas dos tubos, limpas e sexadas, conforme descrito por Butt e Cantu (1962). Após a sexagem das pupas, os machos e as fêmeas foram individualizados em novos tubos de vidro, onde permaneceram até a emergência.

2.4 AVALIAÇÃO DOS ADULTOS DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* SOBREVIVENTES

Os adultos emergidos, machos e fêmeas, com até dois dias de idade e sem deformações foram utilizados na formação dos casais de *S. frugiperda*. Os casais foram transferidos, individualizados, para gaiola constituída por um tubo de PVC (7,0 cm de diâmetro x 10 cm de altura), com a parede interna revestida por papel sulfite, que serviu de substrato de postura. A extremidade inferior da gaiola foi fechada com uma placa de Petri (80 mm x 80 mm) e a superior com um tecido fino do tipo *Voil*. Os adultos foram alimentados nas gaiolas com uma solução de mel a 10,0%, que foi trocada a cada dois dias. Os insetos foram mantidos nestas condições até a morte.

Diariamente, enquanto durou o período de oviposição das fêmeas, as posturas de *S. frugiperda* foram retiradas das gaiolas, contabilizadas e colocadas em placas de acrílico transparente (50 mm x 50 mm) forradas com papel-filtro umedecido com água destilada, visando a eclosão. As placas foram mantidas em laboratório sob condições controladas (temp.: 25±2°C, U.R.: 60±10 % e fotofase: 12 h).

Foram avaliadas a longevidade de macho e fêmea, o período de pré-oviposição e fértil das fêmeas, o número total de posturas, o número total de ovos por fêmea (fecundidade) e a viabilidade dos ovos (fertilidade). A longevidade de macho e fêmea correspondeu ao tempo transcorrido entre a emergência e a morte do inseto. O período fértil das fêmeas correspondeu ao tempo transcorrido entre o primeiro e o último dia de oviposição. O período de pré-oviposição correspondeu ao tempo transcorrido entre a emergência da fêmea até o dia em que ela iniciou a oviposição.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e constituído por onze tratamentos (folhas de milho tratadas com os isolados bacterianos) e um controle (folhas de milho não tratadas). Cada tratamento constou de 15 repetições (gaiolas), contendo cada uma um casal de *S. frugiperda*.

Foram realizados testes de homogeneidade das variâncias e normalidade dos erros e, como as variáveis avaliadas não se ajustaram a estas exigências, os resultados foram submetidos à análise

Kruskal-Wallis e as médias comparadas pelo teste de Bonferroni, a 5% de probabilidade. O Programa estatístico utilizado em todas as análises foi o Statisticx versão 9.0.

3 RESULTADOS

A ingestão, pelas lagartas de *S. frugiperda*, de folhas de milho imersas nas suspensões de bactérias isoladas da planta nim, *A. indica*, afetou todas as variáveis avaliadas, exceto o período de pré-oviposição das fêmeas deste inseto (Tabela 1).

Para a longevidade, foi observada redução no tempo de vida das fêmeas após as lagartas de *S. frugiperda* ingerirem folhas contendo os isolados Epi 9 e Nim 8, o que as fez com que elas vivessem 5,0 dias a menos do que aquelas do controle ($X^2 = 88,1989$; $P < 0,00001$) (Tabela 1). As lagartas que ingeriram os demais isolados resultaram em fêmeas tão longevas quanto as do controle. Os machos também tiveram sua longevidade reduzida ($X^2 = 68,2614$; $P < 0,00001$). Essa redução ocorreu após as lagartas ingerirem os isolados Epi 7, Epi 9, Epi 13, Nim 8 e Nim 12, o que os fez viverem em torno de 3,0 dias a menos do que aqueles do controle. Para os demais tratamentos, os machos foram tão longevos quanto os do controle.

O período de pré-oviposição das fêmeas de *S. frugiperda* não foi alterado pela ingestão dos isolados bacterianos pelas lagartas, que foram semelhantes ao controle ($X^2 = 13,9380$; $P = 0,2364$) (Tabela 1). Entretanto, o período fértil das fêmeas foi reduzido pela ingestão das bactérias pelas lagartas ($X^2 = 38,3200$; $P < 0,0001$). Este fato ocorreu quando as lagartas ingeriram os isolados Epi 9, Epi 12, Nim 8 e Nim 10. Ocorreu uma redução de até 4,0 dias quando elas ingeriram o tratamento Epi 9. Nos demais tratamentos o período fértil das fêmeas foi semelhante ao observado para o controle.

O número de posturas realizadas pelas fêmeas foi reduzido após a ingestão pelas lagartas dos isolados Epi 9 e Nim 10 ($X^2 = 27,0767$; $P < 0,0045$) (Tabela 1). As fêmeas desses tratamentos realizaram no máximo até 3,1 posturas. Nos demais tratamentos, o número de posturas por fêmeas foi semelhante ao controle.

A fecundidade das fêmeas foi reduzida após as lagartas ingerirem os isolados Epi 9, Nim 8, Nim 10 e Nim 12 ($X^2 = 40,6837$; $P < 0,00001$) (Tabela 1). O número de ovos colocados por essas fêmeas variou de 230 a 370. Nos demais tratamentos as fêmeas colocaram em média número de ovos semelhante ao controle. A fertilidade também foi reduzida pela ingestão dos isolados Epi 9 e Nim 12 ($X^2 = 87,8114$; $P < 0,00001$). A viabilidade dos ovos destas fêmeas variou de 32,6% a 46,6%. Para as demais fêmeas avaliadas a viabilidade dos ovos foi semelhante ao controle.

Tabela 1. Longevidade de macho e fêmea (dias), períodos de pré-oviposição e fértil das fêmeas (dias), número de posturas, fecundidade (número) e fertilidade (%) de *Spodoptera frugiperda*, provenientes de lagartas alimentadas com folhas de milho tratadas com suspensão de bactérias isoladas de *Azadirachta indica*.

Isolados	Longevidade*		Período*		Nº de posturas*	Fecundidade*	Fertilidade*
	Fêmea	Macho	Pré - oviposição	Fértil			
Controle	13,8 ± 0,5** bc	12,3 ± 0,4 bc	4,0 ± 0,3 a	6,3 ± 0,3 c	7,1 ± 0,4 b	884,8 ± 76,3 c	96,9 ± 2,2 bc
Epi 1	16,3 ± 0,6 c	12,3 ± 0,8 bc	3,5 ± 0,3 a	5,5 ± 0,7 bc	6,3 ± 1,0 ab	750,6 ± 118,3 bc	100,0 ± 0,0 c
Epi 7	11,9 ± 1,3 ab	9,3 ± 0,7 a	3,8 ± 0,4 a	4,5 ± 0,8 abc	4,7 ± 0,5 ab	434,0 ± 52,6 abc	62,4 ± 9,4 ab
Epi 9	8,5 ± 0,5 a	9,5 ± 0,7 a	4,7 ± 0,9 a	1,8 ± 0,5 a	2,7 ± 0,8 a	230,7 ± 78,2 a	46,6 ± 15,7 a
Epi 12	15,3 ± 0,8 bc	12,9 ± 0,7 c	5,4 ± 0,6 a	3,1 ± 0,6 ab	4,0 ± 0,8 ab	413,9 ± 77,7 abc	84,6 ± 10,4 bc
Epi 13	11,7 ± 0,5 ab	9,3 ± 0,5 a	3,6 ± 0,2 a	4,0 ± 0,6 abc	4,3 ± 0,7 ab	536,1 ± 98,3 abc	100,0 ± 0,0 c
Nim 5	13,6 ± 0,5 bc	10,3 ± 0,4 abc	3,5 ± 0,2 a	4,8 ± 0,6 abc	5,3 ± 0,7 ab	659,9 ± 114,6 abc	96,6 ± 1,7 bc
Nim 8	8,5 ± 0,5 a	9,3 ± 0,5 a	3,6 ± 0,2 a	3,2 ± 0,5 ab	5,1 ± 0,8 ab	370,7 ± 60,3 ab	60,7 ± 11,2 ab
Nim 10	12,5 ± 0,8 abc	12,5 ± 0,5 c	4,4 ± 0,6 a	2,9 ± 0,8 ab	3,1 ± 0,9 a	307,6 ± 91,4 ab	100,0 ± 0,0 c
Nim 12	11,3 ± 0,8 ab	9,5 ± 0,6 a	5,9 ± 0,9 a	3,9 ± 0,9 abc	4,3 ± 0,8 ab	308,2 ± 58,2 ab	32,6 ± 11,3 a
Nim 14	13,7 ± 0,8 bc	10,5 ± 0,5 abc	4,0 ± 0,2 a	4,8 ± 0,7 abc	5,3 ± 0,9 ab	746,9 ± 133,6 abc	97,7 ± 1,2 bc
Nim 15	16,9 ± 0,7 c	13,1 ± 0,5 c	4,1 ± 0,3 a	3,7 ± 0,8 abc	4,0 ± 0,8 ab	472,6 ± 113,0 abc	100,0 ± 0,0 c
X ²	88,20	68,26	13,94	38,32	27,08	40,68	87,81

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho, 64,0% das bactérias isoladas da planta nim causaram algum efeito nocivo aos adultos de *Spodoptera frugiperda*, a ponto de afetarem uma ou mais das variáveis avaliadas (Tabela 1). Foram entomopatogênicas aos adultos as bactérias Epi 7 (*Bacillus pumilus*), Epi 9 (*Bacillus* sp.), Epi 12 (não identificado), Epi 13 (*Bacillus* sp.), Nim 8 (*Bacillus subtilis*), Nim 10 (não identificado) e Nim 12 (não identificado). Esses isolados diferiram quanto a sua virulência aos adultos de *S. frugiperda*. Os isolados Epi 1, Nim 5, Nim 14 e Nim 15 não foram patogênicos aos adultos, já que não provocaram nenhuma alteração nas variáveis avaliadas.

Bactérias Gram-positivas do gênero *Bacillus* possuem diversos mecanismos para infectarem e matarem insetos. Várias espécies deste gênero são entomopatogênicas a diversas Ordens de insetos e, por esse motivo, utilizadas para o controle de pragas (RAJASHEKHAR et al., 2017).

A longevidade de machos e fêmeas de *S. frugiperda* foi reduzida pela ingestão das bactérias entomopatogênicas aos adultos (Tabela 1). Dois dos isolados avaliados, Epi 9 e Nim 8, foram eficazes provocar essa redução tanto nas fêmeas quanto nos machos. Por outro lado, os isolados Epi 7, Epi 13 e Nim 12 somente reduziram a longevidade dos machos. Desses três isolados, Epi 7 e Epi 13, afetaram

somente os machos. O mesmo não foi constatado para o isolado Nim 12 que também afetou as fêmeas, pois reduziu sua fecundidade e fertilidade. Nenhum dos isolados afetou o período de pré-oviposição das fêmeas.

Dentre os 11 isolado avaliados sobre os adultos de *S. frugiperda*, Epi 9, se destacou dos demais, pois além de reduzir a longevidade (fêmeas e machos), também afetou o período fértil, o número de posturas, a fertilidade e a fecundidade das fêmeas. Essa bactéria reduziu em 38,0% o tempo de vida das fêmeas, em 71,0% o período fértil, em 62,5% o número de posturas, além de suas fêmeas serem 74,0% menos fecundas e 51,0% menos férteis.

Várias hipóteses podem explicar este tipo de ação observada para o isolado Epi 9. A patogenicidade desta bactéria pode estar ligada a presença intracelular de um cristal proteico como aquele encontrado na bactéria *Bacillus thuringiensis*, porém o gênero *Bacillus* pode produzir uma ampla gama de substâncias ativas (BRAVO et al., 2007; CRICKMORE et al., 2008; GUTIÉRREZ-MANERO et al., 2001).

A princípio pode se sugerir que a bactéria do Epi 9 foi capaz de produzir cristais ativos que contenha tanto as proteínas Cry como a Cyt. Já foi comprovado em diversos estudos a ocorrência sinergismo entre as proteínas Cry e Cyt, o que causa maior toxicidade da bactéria aos hospedeiros (BRAVO et al., 2007; CRIALESI-LEGOR et al., 2014; ÖSKAN et al., 2003; VILAS-BÔAS et al., 2012; RIBEIRO et al., 2017).

As proteínas Cry e Cyt, são sintetizadas na forma de protoxinas. Desta forma, sua ação depende de processos de ativação, que ocorrem no interior do aparelho digestório do inseto (ANGELO et al., 2010). Já foi demonstrado que a proteína Cyt pode aumentar a toxicidade da proteína Cry que funciona como uma molécula receptora (CRICKMORE et al., 1995; PÉREZ et al., 2005; PONCET et al., 1995). Deste modo, a maior eficiência do isolado Epi 9 esteja ligada, provavelmente, a produção dessas duas proteínas agindo de forma sinérgica, ou seja, a Cry como toxina e a Cyt como seu receptor. Assim, o sinergismo entre Cry e Cyt pode ter provocado danos no sistema digestório das lagartas de *S. frugiperda* e, concomitantemente, redução das variáveis avaliadas, devido a um efeito anti-alimentar, por exemplo, por consequência, uma desnutrição nos insetos. A falta de nutrientes ou mesmo a baixa quantidade assimilada pelas lagartas pode ter afetado a maturação dos ovários das fêmeas e o número de ovariolos presentes o que provocou uma redução na fecundidade e fertilidade das fêmeas (CHAPMAN, 2013).

O *Bacillus* sp. (Epi 9) mostrou-se promissor para ser utilizado em programas de manejo integrado de *S. frugiperda*. Fato importante, pois no Brasil a maioria dos produtos comercializado é a base da bactéria *B. thuringiensis* (Bt) e para o mercado nacional essa tecnologia é importada, o que resulta em um aumento no preço final desse produto ao consumidor e, consequente, uma diminuição na competitividade destes produtos biológicos em relação aos inseticidas sintéticos (ANGELO et al.,



2010). Outro fato importante a ser salientado é que, no mundo, o *B. thuringiensis* é o único inseticida microbiano com uso generalizado e, já existem vários casos de espécies de insetos que desenvolveram resistência a toxina produzida por essa bactéria. Esse é um dos motivos, para que pesquisas venham sendo realizadas para avaliar outras espécies de bactérias (BERGAMASCO et al., 2013; RAJASHEKHAR et al., 2017). As informações obtidas para o isolado Epi 9 abre precedentes para a realização de novos experimentos, agora realizados em campo, visando estudar e comprovar a eficiência desse entomopatógeno em condições de cultivos brasileiros.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro ao projeto e pela concessão de Bolsas de Incentivo a Pesquisa, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (pela concessão de bolsa de Mestrado), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (pela concessão de bolsa de Pesquisa).



REFERÊNCIAS

- ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. Semina: Ciências Agrárias, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010
- ANURADHA, A.; ANNADURAI, R. S.; SHASHIDHARA, L. S. Actincytoskeleton as a putative target of the neem limonoid azadirachtin A. Insect biochemistry and molecular biology, v. 37, n. 6, p. 627-634, 2007.
- BERGAMASCO, V. B.; MENDES, D. R. P.; FERNANDES, O. A.; DESIDÉRIO, J. A.; LEMOS, M. V. F. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). Journal of invertebrate pathology, v. 112, n. 2, p. 152-158, 2013.
- BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.
- BUTT, B. Sex determination of lepidopterous pupae. USDA, Agricultural Research Service Report, v. 33, n. 75, p. 1-7, 1962.
- CARDOSO, A. M. S. Caracterização fisiológica de isolados bacterianos obtidos de *Azadirachta indica* e de bananeira 'Prata-anã'. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 56 p., 2012.
- CHUTULO, E.C.; CHALANNAVAR, R.K. Endophytic mycoflora and their bioactive compounds from *Azadirachta Indica*: A comprehensive review. Journal of Fungi, v. 4, n. 42, p. 1-12, 2018.
- COSTA, E. L. N.; SILVA, R. F. P. da; FIUZA, L. M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. Acta Biologica Leopoldensia, v. 26, n. 2, p. 173-185, 2004.
- CRICKMORE, N.; BONE, E. J.; WILLIAMS, J. A.; ELLAR, D. J. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. FEMS Microbiology Letters, v. 131, n. 3, p. 249-254, 1995.
- D'LUIS, R. L.; CHAMORRO, A. L.; PÉREZ, C. A. Diversidad de bacterias endófitas aisladas de árbol de neem y su actividad inhibitoria contra el *Colletotrichum gloeosporioides* causante de la antracnosis del ñame en el departamento de Sucre. Revista Colombiana de Ciência Animal-RECIA, v. 9, p. 48-54, 2017.
- EID, A.; JARADAT, N.; ELMARZUGI, N. A Review of chemical constituents and traditional usage of Neem plant (*Azadirachta Indica*). Palestinian Medical and Pharmaceutical Journal (PMPJ), v. 2, n. 2, p. 75-81, 2017.
- 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.
- HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. V.; BERG, G.; PIRTILÄ, A. M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 79, p. 293-320, 2015.
- KUSARI, S. HERTWECK, C.; SPITELLER, M. 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.

LUDWIG-MÜLLER, J. Plants and endophytes: Equal partners in secondary metabolite production?. *Biotechnology letters*, v. 37, p. 1325-1334, 2015.

MARTINEZ, S. S. O nim - *Azadirachta indica* - um inseticida natural. Londrina: IAPAR. 2º Ed., 205 p., 2011.

ÖSKAN, M. et al. Nutritional and cultural parameters influencing antidpteran delta-endotoxin production. *Research in Microbiology*, v. 154, n. 1, p. 49-53, 2003.

PÉREZ, C., FERNANDEZ, L. E., SUN, J., FOLCH, J. L., GILL, S. S., SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 51, p. 18303-18308, 2005.

PONCET, S.; DELÉCLUSE, A.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 66, n. 2, p. 131-135, 1995.

RAJAGOPAL, K.; MAHESWARI, S.; KATHIRAVAN, G. Diversity of endophytic fungi in some tropical medicinal plants - A report. *African Journal of Microbiology Research*, v. 6, p. 2822-2827, 2012.

RAJASHEKHAR, M.; SHAHANAZ, E.; VINAY, K. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus* spp. isolated from insects. *Journal of Entomology and Zoology Studies* v. 5, n. 5, p. 581-588, 2017.

RIBEIRO, B. M.; MARTINS, É. S.; DE SOUZA AGUIAR, R. W.; CORRÊA, R. F. T. Expression of *Bacillus thuringiensis* toxins in insect cells. In: *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus*. Springer, Cham, 2017. p. 99-110.

ROEL, A. R.; DOURADO, D. M.; MATIAS, R.; PORTO, K. R.; BEDNASKI, A. V.; COSTA, R. B. D. The effect of sub-lethal doses of *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil on the midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 54, n. 3, p. 505-510, 2010.

SILVA, H. D. Virulência de bactérias associadas a *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG, 73 p., 2014.

SINGH, A. K.; SHARMA, R. K.; SHARMA, V.; SINGH, T.; KUMAR, R.; KUMARI, D. Isolation, morphological identification and *in vitro* antibacterial activity of endophytic bacteria isolated from *Azadirachta indica* (neem) leaves. *Veterinary world*, v. 10, n. 5, p. 510-516, 2017.

SOARES, E. P. S. Patogenicidade de bactérias isoladas de nim à *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG, 82 p., 2013.

VERMA, V. C.; GOND, S. K.; KUMAR, A.; KHARWAR, R. N.; STROBEL, G. The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stem tissues of *Azadirachta indica* A. Juss. (Neem) from Varanasi (India). *Microbial Ecology*, v. 54, n. 1, p. 119-125, 2007.



VERMA, V. C.; GOND, S. K.; KUMAR, A.; MISHRA, A.; KHARWAR, R. N.; GANGE, A. C. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and anti-microbial activity. *Microbial Ecology*, v. 57, n. 4, p. 749-756, 2009.

VERMA, V. C.; GOND, S. K.; KUMAR, A.; KHARWAR, R. N.; BOULANGER, L. A.; STROBEL, G. A. Endophytic fungal flora from roots and fruits of an indian neem plant *Azadirachta indica* A. Juss., and impact of culture media on their isolation. *Indian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 4, p. 469-476, 2011.

VILAS-BÔAS, G. T.; ALVAREZ, R. C.; dos SANTOS, C. A.; VILAS-BOAS, L. A. et al. Fatores de virulência de *Bacillus thuringiensis*: o que existe além das proteínas Cry. *EntomoBrasilis*, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2012.

WILSON, D. Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, v. 73, p. 274-276, 1995.

WU, S. H. CHEN Y. W.; SHAO, S. C.; WANG, L. D.; YU, Y.; LI, Z.Y.; YANG, L. Y.; LI, S. L.; HUANG, R. Two new solanapyrone analogues from the endophytic fungus *Nigrospora* sp. YB-141 of *Azadirachta indica*. *Chemistry & Biodiversity*, v. 6, n. 1, p. 79-85, 2009.