

## **Bactérias isoladas do nim *Azadirachta indica* (Meliaceae) sobre adultos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae)**

*Bacteria isolated from neem *Azadirachta indica* (Meliaceae) on adults of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae)*

Irisléia Pereira Soares de **SOUSA**<sup>1,2</sup>; Teresinha Augusta **GIUSTOLIN**<sup>1</sup>; Herika Dayane da **SILVA**<sup>1</sup>; Adelica Aparecida **XAVIER**<sup>1</sup> & Clarice Diniz Alvarenga **CORSATO**<sup>1</sup>

### **RESUMO**

Este trabalho teve como objetivo avaliar a patogenicidade de bactérias isoladas da planta nim, *Azadirachta indica* (Meliaceae), sobre os adultos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). 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 se constituíram casais, que foram mantidos em gaiolas. Verificaram-se a longevidade de machos e fêmeas, o período de pré-oviposição e fértil, o número total de posturas, a fecundidade e a 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 observadas. 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.

### **ABSTRACT**

This study aimed to evaluate the pathogenicity of bacteria isolated from the neem plant, *Azadirachta indica* (Meliaceae), on adults of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). All evaluated bacterial suspensions were calibrated to a concentration of  $5.0 \times 10^8$  cells / mL. The evaluated adults were the survivors of caterpillars that ingested corn leaves treated with bacterial suspensions. With these surviving adults, couples were formed and kept in cages. The longevity of males and females, the period of pre-oviposition and fertility, the total number of laying, fertility and fertility of the females were verified. Of the total isolates evaluated, 64.0% of them caused some adverse effect on adults, to the point of affecting one or more of the observed variables. The ingestion of bacteria by caterpillars reduced the longevity of adults, male and female. Females had a reduction in the fertile period, in the number of postures, in fertility and fertility. Only the pre-oviposition period was not affected. The *Bacillus* sp. Epi 9, *Bacillus subtilis* and Nim 10 isolates are highlighted because they affect the largest number of variables evaluated. The results obtained in this work are promising and important, as this is the first report of bacteria isolated from neem with pathogenic action to *S. frugiperda*.

**Keywords:** *Azadirachta indica*; biological control; fall armyworm.

Recebido em: 15 jul. 2019

Aceito em: 22 set. 2020

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), Avenida Reinaldo Viana, 2.630, CP 91 – CEP 39440-000, Janaúba, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Autor para correspondência: pereira.irisleia@yahoo.com.br.

## INTRODUÇÃO

As espécies vegetais estão associadas simbioticamente a uma extensa e diversa comunidade de microrganismos, entre eles as bactérias e os fungos (VERMA *et al.*, 2009; HARDOIM *et al.*, 2015). 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 estudadas quanto à sua microbiota é *Azadirachta indica* (Meliaceae), o nim, em virtude da 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 dessa planta já foram avaliadas para uso no controle de insetos e todas elas se mostraram nocivas às pragas. Já se verificou que o nim tem, sobre os insetos, efeito antialimentar, de repelência à oviposição e de inibição de outras atividades biológicas e fisiológicas de tais organismos. Além dessas interferências, o nim pode reduzir o crescimento dos insetos, inibir a ecdise e a reprodução, além de causar a sua morte (COSTA *et al.*, 2004; ROEL *et al.*, 2010). 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 (ANURADHA *et al.*, 2007; MARTINEZ, 2011).

Em *A. indica*, além dos metabólitos secundários, já foram isolados, caracterizados e identificados fungos e bactérias associados de forma simbiótica a essa planta (VERMA *et al.*, 2007; 2009; 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 pois, segundo Kusari *et al.* (2012), no filtrado do seu meio artificial de crescimento se identificaram as substâncias azadiractina A e B. O fungo *Nigrospora* sp., também endofítico do nim, produziu em seu meio de crescimento solanapironas N, O e C, substâncias análogas às produzidas na planta (WU *et al.*, 2009).

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

Cardoso (2012) isolou 33 bactérias associadas à planta nim, entre as quais 16 já foram identificadas: *Bacillus pumilus* (7 associações à planta nim), *Bacillus methylophilicus* (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. O mencionado 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 à patogenicidade e à virulência para as lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae), a lagarta-do-cartucho. O autor verificou que, quando lagartas com 10 dias de idade ingeriram folhas de milho tratadas com as suspensões bacterianas, isso causou aumento na duração e na 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 dessas bactérias isoladas de *A. indica* para o controle de *S. frugiperda*. Esse autor comprovou a ação patogênica de tais 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 à população. Apesar da reconhecida importância dos resultados encontrados pelo mencionado

autor, não foi avaliado, no trabalho dele, o desempenho dos adultos sobreviventes. Na presente pesquisa, esses adultos foram avaliados, pois postula-se que a ingestão, pelas lagartas, dos isolados bacterianos afeta negativamente a fecundidade e a fertilidade dos adultos. Assim, fundamentado nos resultados alcançados por Soares (2013), o presente estudo 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*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho ocorreu nos laboratórios de Entomologia e de Fitopatologia da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), *campus* de Janaúba, Minas Gerais, em agosto de 2018.

O experimento foi efetuado em laboratório, sob condições controladas (temperatura  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa  $60\pm 10\%$  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%. A criação estoque é mantida no laboratório de Entomologia para a realização de experimentos.

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 methylophilicus* – 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). Tais isolados foram obtidos na Bacterioteca do Laboratório de Fitopatologia da Unimontes, *campus* de Janaúba (MG), onde estão armazenados em água mineral esterilizada e mantidos em condições controladas (temperatura  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa  $60\pm 10\%$  e fotofase 14 h). Essas bactérias foram isoladas da superfície (epifítica – Epi) e do extrato fermentado (Nim) de folhas de *Azadirachta indica* (CARDOSO, 2012).

### CULTIVO DAS PLANTAS DE MILHO

Sementes de milho crioulo, suscetível a *S. frugiperda*, foram semeadas em vasos plásticos ( $3,0\text{ dm}^3$ ) e as plantas foram mantidas sob condições de telado, existente na área experimental do *campus* de Janaúba.

Durante o período de cultivo, as plantas não receberam nenhum tratamento fitossanitário para o controle de pragas. Folhas da região do cartucho (conjunto de brácteas basilares de uma inflorescência), 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.

### MULTIPLICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Para a multiplicação dos isolados bacterianos, utilizou-se 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  $120^{\circ}\text{C}/1,0\text{ atm}$ , 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 a obtenção da suspensão bacteriana, sobre as colônias bacterianas incubadas, adicionaram-se 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 desses isolados bacterianos estabelecidas por Silva (2014). Para o ajuste da concentração das suspensões bacterianas, adicionou-se NaCl (0,85 %) estéril.

#### 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), os quais foram imersos, durante 20 segundos, nas suspensões bacterianas. Esse procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. Como controle do experimento, imergiram-se fragmentos em água destilada esterilizada. Os fragmentos tratados e não tratados foram dispostos sobre papel-filtro, para ocorrer a perda do excesso de umidade.

Em recipientes plásticos transparentes (250 mL), contendo em seu fundo uma fina camada de meio ágar-ágar esterilizado, distribuíram-se cinco fragmentos de folhas de milho tratadas ou não tratadas, sendo do tratamento ou do controle a ser avaliado. O ágar-ágar foi utilizado para evitar que as folhas de milho enrolassem e, também, para manter a turgidez delas. Para cada tratamento (isolados e controle), prepararam-se três desses recipientes. Em cada um dos recipientes, sobre as folhas de milho, transferiram-se, aproximadamente, 200 lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda*, e os recipientes foram fechados com tampas. As lagartas alimentaram-se dessas folhas por três dias, e depois o alimento foi substituído por outras folhas, não tratadas. As lagartas alimentaram-se 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. Realizou-se a troca de alimento nessa etapa do experimento 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 & Cantu (1962). Após a sexagem das pupas, os machos e as fêmeas foram individualizados em novos tubos de vidro, onde permaneceram até a emergência.

#### 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 nessas 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 à eclosão. As placas

foram mantidas em laboratório sob condições controladas (temperatura  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa  $60\pm 10\%$  e fotofase 12 h).

Avaliaram-se 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 11 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*.

Realizaram-se testes de homogeneidade das variâncias e normalidade dos erros e, como as variáveis avaliadas não se ajustaram a tais 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 Statistix versão 9.0.

## 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 desse inseto (tabela 1).

Para a longevidade, observou-se 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 viver 5,0 dias a menos do que as 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 ( $X^2 = 68,2614$ ;  $P < 0,00001$ ) quando ingeriram os isolados Epi 7, Epi 9, Epi 13, Nim 8 e Nim 12, o que fez esses machos viver em torno de 3,0 dias a menos do que os 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, já que o período de pré-oviposição com ingestão de isolados foi semelhante ao controle ( $X^2 = 13,9380$ ;  $P = 0,2364$ ) (tabela 1).

O período fértil das fêmeas foi reduzido pela ingestão das bactérias pelas lagartas ( $X^2 = 38,3200$ ;  $P < 0,0001$ ). Tal fato ocorreu quando as lagartas ingeriram os isolados Epi 9, Epi 12, Nim 8 e Nim 10. Houve 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 do 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 postos por essas fêmeas variou de 230 a 370. Nos demais tratamentos, as fêmeas colocaram, em média, um número de ovos semelhante ao do 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 dessas fêmeas variou de 32,6% a 46,6%. Para as demais fêmeas avaliadas, a viabilidade dos ovos foi semelhante à do controle.

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

Isolados	Longevidade*		Período*		N.º 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
Nim12	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 <sup>2</sup>	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.

\*\* X ± S(X)

## DISCUSSÃO

No presente 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 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 infectar e matar insetos. Várias espécies desse 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 em 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 sua fertilidade. Nenhum dos isolados afetou o período de pré-oviposição das fêmeas.

Entre os 11 isolados avaliados sobre os adultos de *S. frugiperda*, Epi 9 destacou-se 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.

Há várias hipóteses para explicar o tipo de ação observada para o isolado Epi 9. A patogenidade dessa bactéria pode estar ligada à presença intracelular de um cristal proteico como o encontrado na bactéria *Bacillus thuringiensis*, porém o gênero *Bacillus* é capaz de produzir uma ampla gama de substâncias ativas (GUTIERREZ-MAÑERO *et al.*, 2001; BRAVO *et al.*, 2007; CRICKMORE *et al.*, 2018).

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

As proteínas Cry e Cyt são sintetizadas sob a forma de protoxinas. Dessa 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, a qual funciona como uma molécula receptora (CRICKMORE *et al.*, 1995; PONCET *et al.*, 1995; PÉREZ *et al.*, 2005). Desse modo, é provável que a maior eficiência do isolado Epi 9 esteja ligada à produção dessas duas proteínas, as quais agem de forma sinérgica, ou seja, a Cry como toxina e a Cyt como seu receptor. Assim, o sinergismo entre Cry e Cyt pode ter causado danos ao sistema digestório das lagartas de *S. frugiperda* e, concomitantemente, redução das variáveis avaliadas, em virtude de um efeito antialimentar, por exemplo, e 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 ovários presentes, o que provocou uma redução na fecundidade e na fertilidade das fêmeas (CHAPMAN, 2013).

A espécie *Bacillus* sp. (Epi 9) mostrou-se promissora para ser utilizada em programas de manejo integrado de *S. frugiperda*. Tal fato é importante, pois no Brasil a maioria dos produtos de manejo integrado comercializados é à base da bactéria *B. thuringiensis* (Bt) e, para o mercado nacional, essa tecnologia é importada, o que resulta em um aumento no preço final do produto ao consumidor e, conseqüentemente, uma diminuição na competitividade desses produtos biológicos em relação aos inseticidas sintéticos (ANGELO *et al.*, 2010). Outro fato importante a ser salientado é que, no mundo, *B. thuringiensis* é o único inseticida microbiano com uso generalizado, e já existem vários casos de espécies de insetos que desenvolveram resistência à toxina produzida pela bactéria. Esse é um dos motivos pelos quais pesquisas vêm sendo realizadas para avaliar outras espécies de bactérias que tenham a mesma ação (BERGAMASCO *et al.*, 2013; RAJASHEKHAR *et al.*, 2017).

As informações obtidas para o isolado Epi 9 abrem precedentes para a realização de novos experimentos, agora a serem realizados em campo, visando estudar e comprovar a eficiência desse entomopatógeno em condições de cultivos brasileiros.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) (projeto DEG – DEG-00001-16) o suporte financeiro ao projeto e a concessão de bolsas de incentivo à pesquisa; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) a concessão de bolsa de mestrado; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) a 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. 2010; 31(4): 945-958.
- Anuradha, A., Annadurai, R. S. & Shashidhara, L. S. Actincytoskeleton as a putative target of the neem limonoid azadirachtin A. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2007; 37(6): 627-634.
- 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. 2013; 112(2): 152-158.

- Bravo, A., Gill, S. S. & Soberon, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. 2007; 49(4): 423-435.
- Butt, B. A. & Cantu, E. Sex determination of Lepidopterous pupae. Washington: USDA; 1962. 7 p.
- Cardoso, A. M. S. Caracterização fisiológica de isolados bacterianos obtidos de *Azadirachta indica* e de bananeira “Prata-anã” [Monografia de Graduação em Agronomia]. Janaúba: Universidade Estadual de Montes Claros; 2012.
- Chapman, R. F. The insects: structure and function. Cambridge: Cambridge University Press; 2013. 929 p.
- Chutulo, E. C. & Chalannavar, R. K. Endophytic mycoflora and their bioactive compounds from *Azadirachta indica*: a comprehensive review. *Journal of Fungi*. 2018; 4(42): 1-12.
- Costa, E. L. N., Silva, R. F. P. da & Fiuza, L. M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. *Acta Biológica Leopoldensia*. 2004; 26(2): 173-185.
- Crialesi-Legor, P. C. B., Davolos, C. C., Lemes, A. R. N., Marucci, S. C., Lemos, M. V. F., Fernandes, O. A. & Desidério, J. A. Interação de proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* para controle de lepidópteros praga. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2014; 49: 79-87.
- Crickmore, N., Bone, E. J., Williams, J. A. & Ellar, D. J. Contribution of the individual components of the  $\delta$ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiology Letters*. 1995; 131(3): 249-254.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A. & Dean, D. H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/intro.html](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/intro.html). Acesso em: 26 out. 2018.
- 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*. 2017; 9: 48-54.
- Eid, A., Jaradat, N. & Elmarzugi, N. A review of chemical constituents and traditional usage of Neem plant (*Azadirachta indica*). *Palestinian Medical and Pharmaceutical Journal*. 2017; 2(2): 75-81.
- Greene, G. L., Lepla, N. C. & Dickerson, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*. 1976; 69(4): 488-497.
- Gutierrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A. N., Mehouchi, J., Tadeo, F. R. & Talon, M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilis* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*. 2001; 111: 206-211.
- Hardoim, P. R., Overbeek, L. S. V., Berg, G., Pirttilä, 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*. 2015; 79: 293-320.
- Kusari, S., Hertweck, C. & Spiteller, M. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012; 28(3): 1287-1294.
- Ludwig-Müller, J. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnology Letters*. 2015; 37: 1325-1334.
- Martinez, S. S. O nim – *Azadirachta indica* – um inseticida natural. 2. ed. Londrina: Iapar; 2011. 205 p.
- Öskan, M., Dilek, F. B., Yetis, U. & Özcengiz, G. Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. *Research in Microbiology*. 2003; 154(1): 49-53.
- 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*. 2005; 102(51): 18303-18308.

- 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*. 1995; 66(2): 131-135.
- Rajagopal, K., Maheswari, S. & Kathiravan, G. Diversity of endophytic fungi in some tropical medicinal plants – a report. *African Journal of Microbiology Research*. 2012; 6: 2822-2827.
- Rajashekhar, M., Shahanaz, E. & Vinay, K. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus* spp. isolated from insects. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2017; 5(5): 581-588.
- Ribeiro, B. M., Martins, É. S., De Souza Aguiar, R. W. & Corrêa, R. F. T. Expression of *Bacillus thuringiensis* toxins in insect cells. In: Fiuza, L. M., Polanczyk, R. A. & Crickmore, N. (Eds.). *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: characterization and use in the field of biocontrol. Cham: Springer; 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*. 2010; 54(3): 505-510.
- Silva, H. D. Virulência de bactérias associadas a *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda* [Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido]. Janaúba: Universidade Estadual de Montes Claros; 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*. 2017; 10(5): 510-516.
- Soares, E. P. S. Patogenicidade de bactérias isoladas de nim à *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) [Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido]. Janaúba: Universidade Estadual de Montes Claros; 2013.
- 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*. 2011; 51(4): 469-476.
- 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*. 2007; 54(1): 119-125.
- 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*. 2009; 57(4): 749-756.
- Vilas-Bôas, G. T., Alvarez, R. C., dos Santos, C. A. & Vilas-Boas, L. A. Fatores de virulência de *Bacillus thuringiensis*: o que existe além das proteínas Cry. *EntomoBrasilis*. 2012; 5(1): 1-10.
- Wilson, D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*. 1995; 73: 274-276.
- 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*. 2009; 6(1): 79-85.