

EFEITO DE *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* SOBRE IMATUROS DE *Anastrepha fraterculus* (DIPTERA: TEPHRITIDAE) EM LABORATÓRIO

LILIANE NACHTIGALL MARTINS¹; ANA PAULA DE SOUZA STORI DE LARA²;
MÁRCIO SOUZA FERREIRA²; ADRISE MEDEIROS NUNES²; FÁBIO PEREIRA
LEIVAS LEITE²; FLÁVIO ROBERTO MELLO GARCIA³

¹Programa de Pós-Graduação em Entomologia – UFPel – llinachtigall@hotmail.com

² Programa de Pós-graduação em Parasitologia -UFPel – ana.paula.central@hotmail.com

² Bolsista de Iniciação Científica CNPq - UFPel – marcisofer@gmail.com

² Prefeitura Municipal de Pelotas – adrisenunes@gmail.com

² Docente do Núcleo de Biotecnologia-UFPel – fabio@leivasleite.com.br

³ Programa de Pós-Graduação em Entomologia - UFPel – flaviormg@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

As moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) são os principais insetos-praga que causam danos à fruticultura brasileira e mundial. Além dos danos diretos, o dano indireto, acaba sendo o mais prejudicial, devido às barreiras fitossanitárias impostas pelos países importadores (GARCIA, 2009).

Na região Sul do Brasil, a mosca-das-frutas sul-americana *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) representa a principal espécie capturada nos pomares, sendo responsável por prejuízos às frutíferas temperadas (GARCIA; CORSEUIL, 1998; GARCIA; NORRBOM, 2011).

O controle populacional de *A. fraterculus* tem sido realizado através de iscas tóxicas a base de proteína hidrolisada associada a um inseticida (RIBEIRO, 2010). As pulverizações com inseticidas podem acarretar problemas de contaminação ambiental, de saúde humana, além de problemas sociais e econômicos. No entanto, novas tecnologias estão sendo exploradas com intuito de diminuir os impactos ambientais e contribuir no seu manejo.

Os inseticidas à base de microrganismos entomopatogênicos ou bioinseticidas participam apenas com 1% do montante (ALMEIDA; BATISTA-FILHO, 2001) A utilização de agentes entomopatogênicos no controle de insetos-praga merece destaque devido a especificidade pelo hospedeiro, a seletividade aos insetos benéficos, a inocuidade a animais endotérmicos e o fato de não poluírem o meio ambiente, além de apresentarem formas de resistência que aumentam a persistência no campo. Dentre os microrganismos patogênicos aos insetos encontram-se bactérias, vírus, fungos, nematóides, protozoários (ALVES, 1998).

O uso de *Bacillus thuringiensis* Berliner (1911, 1915) vem sendo utilizado separado ou associado a outras formas de controle no Manejo Integrado de Pragas. É considerada a espécie de maior interesse, sendo utilizada para o manejo de diversas ordens de insetos-praga na agricultura como: Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, além de dipteros vetores de doenças humanas como os mosquitos do gênero *Culex*, *Aedes* e *Simulium* (CAVADOS et al., 2001).

Neste contexto, objetivou-se verificar a eficiência de *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* sobre o desenvolvimento de imaturos de *A. fraterculus* em condições de laboratório.

2. METODOLOGIA

O estudo foi conduzido no Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel na Universidade Federal de Pelotas, onde está estabelecida a criação de *A. fraterculus*. Os isolados de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* são provenientes da Coleção de microrganismos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da UFPel. O bioensaio foi mantido em câmara climatizada BOD a $25\pm1^{\circ}\text{C}$, $75\pm10\%$ U.R. e fotofase de 12h no Laboratório de Ecologia de Insetos do Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética da UFPel.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado arranjado em esquema unifatorial, com três repetições. O fator de tratamento testado foi a presença da bactéria *Btk* (com e sem). Cada unidade amostral foi composta por 30 ovos de *A. fraterculus* em 200 ml dieta artificial descrita por Salles (1992) e adaptada por Nunes et al. (2013), com aplicação de 2 mL de suspensão bacteriana contendo $2 \times 10^9 \text{ UFC}^{-\text{ml}}$, na testemunha foi utilizada apenas dieta. Os ovos foram colocados sobre papel filtro em potes plásticos de 500ml. Após 10 dias, as larvas foram transferidas para vermiculita fina para a pupação.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p\leq0,05$). Constatando-se significância estatística, os efeitos da presença da bactéria *Btk* foram comparados pelo teste t ($p\leq0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A bactéria *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em dieta larval causou redução da viabilidade larval e ocasionando deformações nas mesmas. No último ínstar larval não houve esclerotização da última camada de cutícula para a formação de pupa. No mesmo teste ainda pode-se observar larvas tipicamente normais mas que ao pupar tiveram deformações, gerando adultos anormais, na maioria dos quais não houve desenvolvimentoalar, reduzindo, por consequência, a capacidade de dispersão dos mesmos. Na testemunha nenhum tipo de deformação ocorreu e a mortalidade na fase larval foi de 10%, assim como na fase de pupa, não houveram adultos deformados e nem mortos neste bioensaio. (Tabela 1).

Tabela 1: Percentual de deformação larvas, pupas e adultos de *A. fraterculus* com e sem a inclusão de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* na dieta em laboratório.

Tratamentos	% Larvas normais	% Larvas deformadas	% Pupas normais	% Pupas deformadas	% Adultos normais	% Adultos deformados
Testemunha	90	0	90	0	100	0
	93,33	0	93,33	0	100	0
	86,66	0	86,66	0	100	0
<i>Btk</i>	53,33	46,67	87,5	12,5	35,7	64,28
	36,66	63,34	90,9	9,1	40	60
	73,33	26,67	63,63	36,37	21,42	78,57

A ação de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* deve-se a presença de cristais formados por diferentes proteínas Cry, esses cristais são sintetizadas pelos genes *cry* presentes nos isolados, os quais determinam o espectro inseticida dos mesmos, de acordo com Schnepf et al. (1998).

Para a variável Larvas normais não ocorreu significância para o fator de tratamento testado (Tabela 2). No que se refere as outras variáveis os dados foram significativos pelo teste F ($F = 1,12$) e pelo teste t.

Tabela 2 - Médias \pm erro padrão de larvas normais (Ln), pupas normais (Pn), pupas deformadas (Pd), adultos normais (An) e adultos deformados (Ad) com e sem *Btk* em dieta de *A. fraterculus* em laboratório.

<i>Btk</i>	Ln	Pn	Pd	An	Ad
Com	80,68 \pm 8,58 NS	19,32 \pm 8,58 b ^{1/}	80,68 \pm 8,8 a	32,37 \pm 5,61 b	67,62 \pm 5,6 a
Sem	90,00 \pm 1,92	90,00 \pm 1,92 a	0,00 \pm 0,00 b	100,00 \pm 0,00 a	0,00 \pm 0,00 b
C.V. (%)	12,6	19,7	26,0	10,4	20,3

^{NS}: não significância pelo teste F ($p\leq 0,05$) da análise de variância. ^{1/} Médias (\pm erro padrão) acompanhadas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t ($p\leq 0,05$). C.V.: coeficiente de variação. Ln (larvas normais), Pn (pupas normais), Pd (pupas deformadas), An (adultos normais), Ad (adultos deformados).

A susceptibilidade de larvas de dípteros como *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) e *Musca domestica* (L., 1758) com diferentes tipos de bactérias entomopatogênicos tem sido demonstrado por vários autores (LONC et al., 1997; LONC; SATTA; FLORIS 2001; JOHNSON et al., 1998; GOUGH et al., 2002; RIU et al., 2006, 2011). O presente estudo baseou-se na metodologia utilizados por Zimmer et al. (2013), adicionando a suspensão bacteriana em dieta oferecendo aos imaturos de *Musca domestica*.

Martins et al. (2016) utilizaram *Bti* sobre imaturos de *A. fraterculus*, as larvas tiveram uma redução de 22,3%, no entanto uma maior patogenicidade de *Btk* era esperada visto que esta cepa já vem sendo utilizada, através de produto formulado e comercialmente disponível. A eficiência de controle dessa cepa já foi verificada para diferentes espécies-praga como *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae), *Anthonomus grandis* (Boheman, 1843) (Coleoptero: Curculionidae), *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera: Culicidae) (PRAÇA et al., 2004). Esta cepa ainda não havia sido testada para a mosca-das-frutas sul-américa até então.

4. CONCLUSÕES

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* é eficiente na redução dos estágios imaturos de *A. fraterculus*, sendo uma alternativa promissora para uso no controle biológico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos.** 2^a ed. São Paulo: Editora Fealq, 1998.
- ALMEIDA, J.E.M.; B ATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.20. n.2. p.30-33. 2001.
- CAVADOS, C.F.G.; FONSECA, R.N.; CHAVES, .JQ.; RABINOVITCH, L.; ARAÚJO COUTINHO. Identification of entomopathogenic *Bacillus* isolated from *Simulium* (Diptera: Simuliidae) larvae and adults. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 1. P. 1017-1021, 2001.
- GARCIA, F.R.M.; CORSEUIL, E. Análise faunística de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em pomares de pessegueiro em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.15, n.4, p.1111-1117, 1998.

- GARCIA, F. R. M. Fruit fly: biological and ecological aspects. In: BANDEIRA, R. R. (Ed.) Current trends in fruit flies control on perennial crops and research prospects. Kerala: **Transworld Research Network**, p. 1-35, 2009.
- GARCIA, F.R.M.; NORRBOM, A.L. Tephritoid flies (Diptera, Tephritoidea) and their plant hosts from the state of Santa Catarina in southern Brazil. **Florida Entomologist**, v. 94, p. 151–157, 2011.
- GOUGH, J.M.; AKHURST, R.J.; ELLAR, D.J.; KEMP, D.H.; WIJFFELS, G.L. New isolates of *Bacillus thuringiensis* for control of livestock ectoparasites. **Biological Control**, v. 23, p. 179–189, 2002.
- JOHNSON, C.; BISHOP, A.H.; TURNER, C.L. Isolation and activity of strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to larvae of the housefly (Diptera: Muscidae) and tropical blowflies (Diptera: Calliphoridae). **Journal Invertebrate Pathology**, v.71, p.138–144, 1998.
- LONG, E.; LECADET, M.; LACHOWICZ, T.; PANEK, E. Description of *Bacillus thuringiensis wratislaviensis* (H-47), a new serotype originating from Wroclaw (Poland), and other Bt soil isolates from the same area. **Letters Applied Microbiology**, v.24, p. 467–473, 1997.
- LONG, E.; DOROSZKIEWICZ, W.; KLOWDEN, M.; RYDZANICZ, K.; GALGAN, A. Entomopathogenic activities of environmental isolates of *Bacillus thuringiensis* against dipteran larvae. **Journal of Vector Ecology**, v. 26, p.15–20, 2001.
- MARTINS, N.L.; LARA, S.S.A.; SANTOS, A.L.; FERREIRA, S.M.; LEITE, L.P.F.; GARCIA, M.R.F.; Efeitos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre imaturos e adultos de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) em laboratório. In: **XXVI congresso brasileiro de entomologia e IX congresso latino-americano de entomologia**. Maceió – AL, 2016.
- NUNES, M.A.; COSTA, Z.K.; FAGGIONI, M.K.; COSTA, Z.L.M.; GONÇALVES, S.R.; WALDER, M.M.J.; GARCIA, S.M.; NAVA, E.D. Dietas artificiais para a criação de larvas e adultos da mosca-das-frutas sul-americana. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v.48, n.10, p.1309-1314, 2013.
- PRAÇA, L.B.; BATISTA, A.C.; MARTINS, E.S.; SIQUEIRA, C.B.; DIAS, D.G.S.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R.G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.1, p.11-16, 2004.
- RIBEIRO, L.G. Manejo das principais pragas da macieira no Brasil. **Revista Agropecuária Catarinense**, v.23, p.149-157, 2010.
- RUIU, L.; DELRIO, G.; ELLAR, D.J.; FLORIS, I.; PAGLIETTI, B.; RUBINO, S.; SATTA, A. Lethal and sublethal effects of *Brevibacillus laterosporus* on the housefly (*Musca domestica*). **Entomologia Experimentalis Applicata**, v.118, p.137–144, 2006.
- RUIU, L.; SATTA, A.; FLORIS, I. Comparative applications of azadirachtin and *Brevibacillus laterosporus* based formulations for house fly management experiments in dairy farms. **Journal of Medical Entomology**, v.48, n.2, p. 345–350, 2011.
- SALLES, L.A.B. **Algunas bases para el control biológico de la mosca de los frutos *Anastrepha fraterculus***. Apostila, 1992. 17p.
- SCHNEPF, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington DC, v.62, p.775-806, 1998.
- ZIMMER, C.; CASTRO, L.; PIRES, S.; MENEZES, A.; RIBEIRO, P.; LEIVAS LEITE, F. Efficacy of entomopathogenic bacteria for control of *Musca domestica*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 114, n. 241-244, 2013.