

ISOLAMENTO DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER A PARTIR DE AMOSTRAS DE SOLOS E SUA PATOGENICIDADE PARA *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

ISOLATION OF *Bacillus thuringiensis* BERLINER FROM SOIL SAMPLES AND ITS PATHOGENICITY TO *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

POLANCZYK, Ricardo A.¹; SILVA, Rogério F. P.da²; FIUZA, Lidia M.³

RESUMO

A bactéria *Bacillus thuringiensis* é um importante patógeno que pode ser utilizado para reduzir a utilização de agrotóxicos. Deste modo, o isolamento, identificação e seleção de isolados contra pragas de difícil controle, como *Spodoptera frugiperda*, são etapas importantes e essenciais para inserir este patógeno no contexto do manejo integrado. Nas 85 amostras de solos oriundas dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, foi constatada a presença de 772 colônias bacterianas, das quais 371 pertencem a *Bacillus* spp. e 293 (79%) foram identificados como *B. thuringiensis*. Foi avaliado o efeito patogênico de 139 destes isolados para lagartas de segundo instar de *S. frugiperda*. Apenas sete foram patogênicos (UFRGS 68-5, UFRGS 48-2, UFRGS 68-3, UFRGS 68-6, UFRGS 93-2, UFRGS 98-1 e UFRGS 98-4), sendo o primeiro o mais efetivo com 45% de mortalidade. São discutidas também razões para o reduzido número de isolados ativos para a espécie-alvo bem como a sua distribuição nos solos amostrados.

Palavras-chave: controle biológico, entomopatógeno, lagarta-do-cartucho, bioensaios.

INTRODUÇÃO

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta-do-cartucho, é considerada um dos principais insetos-praga da agricultura brasileira com ampla distribuição em praticamente todos os Estados brasileiros. Este noctuídeo ocorre também no sul dos Estados Unidos, México, demais países da América do Sul e Central (WISEMAN et al., 1966).

Esta praga é altamente polífaga, atacando algodão, alfaça, amendoim, arroz, aveia, batata, batata-doce, cana-de-açúcar, hortaliças, milho, soja e trigo, sendo mais comum em gramíneas. Já na década de 1920, existiam relatos desta praga em vários locais do Brasil, causando severos danos em muitas culturas (LEIDERMAN & SAUER, 1953). Segundo CRUZ et al. (1999), as perdas estimadas pela lagarta-do-cartucho no Brasil ficam em torno de US\$ 40 milhões por ano.

No milho, em especial, segundo CARVALHO (1970), *S. frugiperda* causa perda de 20% na produção de grãos, quando o desfolhamento ocorre próximo à floração. GASSEN (1994) enfatiza que os maiores danos ocorrem na fase em que a planta apresenta de oito a 10 folhas, podendo ocorrer uma redução de

19% no rendimento de grãos. SILVA et al. (1983) ressaltam que em caso de infestação intensa, pode ocorrer a destruição completa das plantas de milho. Sua presença evidencia-se por folhas danificadas, com dejeções secas e úmidas no centro da planta.

A utilização de produtos químicos para controlar esta praga embora seja o método mais estudado e difundido, apresenta uma série de problemas, como: redução dos inimigos naturais, poluição do ambiente, rápida evolução da resistência do inseto, riscos na aplicação e alto custo (VALICENTE et al., 1989; CRUZ et al., 1997). Na busca de novas alternativas visando a redução ou substituição dos inseticidas, os entomopatógenos possuem excelente potencial para serem empregados como método visando minimizar o impacto das pragas sobre a produção agrícola.

A bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) destaca-se no cenário mundial desde 1938, quando o primeiro produto formulado com este patógeno foi lançado na França. Desde então mais de 100 produtos foram lançados no mercado e atualmente constituem mais de 90% do faturamento com bioinseticidas (BEEGLE & YAMAMOTO, 1992; GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

Em alguns estudos realizados, esta bactéria foi considerada pouco eficiente no controle de *S. frugiperda* (LIMA & ZANUNCIO, 1976; GARCIA et al. 1982). Porém, com os avanços proporcionados por novas técnicas laboratoriais e maior interesse dos pesquisadores resultados positivos foram obtidos (HERNANDEZ, 1988; BOHOROVA et al. 1996 e 1997, DIAS et al. 1999).

O *Bt* é encontrado em todos os ambientes terrestres e também em insetos mortos, plantas e detritos (BERNHARD et al., 1997; HOSSAIN et al., 1997; FORSYTH & LOGAN, 2000; HONGYU et al., 2000; MAEDA et al., 2000; MARTÍNEZ & CABALLERO, 2002; SILVA et al., 2002; URIBE et al., 2003; WANG et al., 2003). Os métodos para isolar este patógeno são eficientes e normalmente de fácil execução (SALEH et al., 1969; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985; TRAVERS et al., 1987; SWIECICKA et al., 2002). O número de células obtidas de *Bt* varia entre 10^2 e 10^4 unidades formadoras de colônias (ufc) por grama de solo, enquanto que em plantas este número varia entre 0 e 100 ufc cm⁻² (DAMGAARD, 2000).

¹ Eng. Agr. Prof. Dr. Entomologia. Laboratório de Entomologia, Departamento de Fitotecnia. Centro de Ciências Agrárias. Universidade do Espírito Santo (UFES). Alto Universitário s/n. Centro – Alegre (ES). CEP 29500-000. E-mail: ricardo@cca.ufes.br

² Eng. Agr. Doutor em Entomologia. Professor Adjunto. Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia (UFRGS).

³ Eng. Agr. Pós-doutorado em Biologia Molecular. Professor Adjunto. Laboratório de Microbiologia – Centro 2 (UNISINOS)

Taxonomicamente, embora o termo *Bt* geralmente seja empregado para um única espécie, na verdade ele pertence a um complexo denominado *B. cereus* (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, e *B. weihenstephanensis*). *Bt* e *B. cereus*, por exemplo, mostram características fenotípicas e bioquímicas comuns mas, por definição e com fins práticos, *Bt* pode ser diferenciado de *B. cereus* pela presença dos cristais responsáveis pela sua atividade tóxica (GLARE, 2000; HANSEN & SALAMITOU, 2000).

As proteínas tóxicas Cry, codificadas por genes *cry* e responsáveis pela atividade inseticida deste patógeno são sintetizadas durante a fase estacionária do crescimento bacteriano se acumulam na célula-mãe, na forma de inclusão cristalina que pode ser responsável por mais de 25% do peso seco das células (AGAISSE & LERECUS, 1995). Após a ingestão dos esporos + cristais pelo inseto, os cristais constituídos de protoxinas, são solubilizados pelo pH alcalino, originando as protoxinas que, em presença de enzimas digestivas, são convertidas em 4 ou mais polipeptídeos tóxicos (δ -endotoxinas). As toxinas hidrolizadas cruzam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos na membrana apical das células colunares do intestino médio, interferindo no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana, o que leva à formação de poros que aumentam a permeabilidade da mesma. O aumento na absorção de água causa divisão celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio. O inseto também pode morrer por inanição, uma vez que, pouco tempo após a infecção o inseto pára de se alimentar (HOFTE & WHITELEY, 1989; COPPING & MENN, 2000).

Apesar de alguns isolados de *Bt* mostrarem atividade tóxica para esta espécie-praga, estes ainda são poucos, justificando-se a necessidade de mais trabalhos para buscar isolados mais ativos.

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou o isolamento de *Bt*, a partir de amostras de solos oriundas de regiões agrícolas do sul do Brasil, bem como a análise da patogenicidade dos isolados contra as lagartas de *S. frugiperda*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção de isolados de *Bt* foram processadas 85 amostras de solos, sendo 80 oriundas de 43 municípios do Rio Grande do Sul, duas de Santa Catarina e três do Paraná. O maior número de amostras obtidas foram provenientes de Caxias do Sul (6), Porto Alegre (5) e Cruz Alta (5). As amostras mais frequentes correspondem a áreas com atividade agrícola, voltadas para a olericultura e fruticultura.

A criação dos insetos foi efetuada em sala climatizada a 25°C, 60±10% UR e fotofase de 12 h, sendo as lagartas alimentadas com dieta de Bowling (BOWLING, 1967) e, os adultos com solução glicosada a 10%. Para o isolamento de *Bt* a partir de amostras de solos, obtidas de diversas regiões do Sul do Brasil, foi utilizado o método descrito no protocolo da World Health Organization (OMS) (WHO, 1985), idêntico ao utilizado por DIAS et al. (1999).

Neste procedimento, cada amostra de 1 g de solo foi homogeneizada em 10 mL de solução salina (0,006 mM FeSO₄.7H₂O; 0,01 mM CaCO₃.7H₂O; 0,08 mM MgSO₄.7H₂O; 0,07 mM MnSO₄.7H₂O; 0,006 mM ZnSO₄.7H₂O; pH 7,0) e submetida a agitação (80 rpm, 28°C), durante 24 h. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para tubo de microcentrífuga tipo "ependorf" e, após choque térmico (80°C por 12 minutos) para eliminar as células vegetativas, foi diluída 10 e 100 vezes

em solução salina. Uma alíquota de 100 µL da última diluição foi distribuída em placa de Petri contendo ágar nutritivo (0,5% extrato de levedura; 0,1% de tripton; 0,17 M NaCl e 0,15% de ágar bacteriológico). O material foi então mantido em estufa, 30°C, 12:12 h (luz e escuro), durante 48 horas.

As colônias bacterianas obtidas foram avaliadas quanto a morfologia, selecionadas para as características correspondentes a bacilos, transferidas para meio líquido seletivo com penicilina G (100 mg/L) a *Bt* e *B. cereus* (JUNG et al., 1998) e mantidos por 24 ou 48 horas a 30°C e 180 rpm em incubador rotativo. Após este período, o cultivo foi observado em microscopia de contraste de fase (1.000 x) para a verificação da presença de corpos de inclusões paraesporais (cristais), característica de *B. thuringiensis*. Os isolados selecionados como *Bt* foram cultivados em Meio Usual Glicosado (MUG) (DE BARJAC & LECADET, 1976) até a esporulação, sendo em seguida centrifugados por 15 min a 10.000 rpm e o "pellet" obtido conservado a -18°C.

O Índice *Bt* médio, que corresponde ao número de isolados de *B. thuringiensis* obtidos em relação ao número total de isolados, foi calculado conforme HOSSAIN et al. (1997). Parte destes foram identificados quanto à subespécie através de análise sorológica realizada no laboratório de bactérias entomopatogênicas do Instituto Pasteur (Paris, França). Para os ensaios biológicos, os isolados de *Bt* foram cultivados em MUG a 28°C e 180 rpm por 48 horas. Após a lise bacteriana, o material foi submetido a centrifugações consecutivas (15 minutos a 10.000 rpm) para eliminação do meio de cultura e lavagem do concentrado obtido. Em seguida, foram preparadas suspensões de 10⁻¹ e 10⁻² em água destilada esterilizada, determinando-se o número de células bacterianas conforme metodologia descrita por ALVES & MORAES (1998).

Uma alíquota de 100 µL de suspensão de *Bt*, na concentração de 3 x 10⁸ esporos + cristais/mL, foi aplicada na superfície dos discos de dieta artificial, previamente distribuídos em placas de acrílico (35 mm de diâmetro). Após a evaporação do excesso de umidade, 20 lagartas de segundo instar foram acondicionadas individualmente. No lote correspondente a testemunha aplicou-se água destilada e esterilizada, em volume equivalente aos lotes tratados. Para acondicionamento do material, utilizou-se câmara incubadora tipo B.O.D., regulada para 25°C, 65% ± 10% UR e 12 h de fotofase. Os tratamentos foram avaliados diariamente até o 7º dia após a aplicação. A mortalidade observada foi corrigida conforme ABBOTT (1925) e os dados transformados para $\sqrt{x+0,5}$. Após, quando adequado, foi utilizado teste de Tukey (5%) para análise dos dados através do programa SANEST (ZONTA et al. 1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 85 amostras analisadas em apenas uma, oriunda de Ipê (RS), não foi verificado crescimento bacteriano, sendo nas demais constatada a presença de 772 colônias bacterianas (CB), das quais 371 (50,27%) foram preliminarmente selecionadas como isolados de *Bacillus* (denominados de UFRGS). Dentre estas 293 (79,0%) foram identificados como *B. thuringiensis* (*Bt*) (Tabela 1) e 78 (21,0%) como *B. cereus*. Em 129 isolados (44,0%) de *Bt* foi possível determinar o tipo morfológico dos corpos de inclusões paraesporais (CIP) (bipiramidal, esférico, retangular e irregular). Apenas seis isolados apresentaram cristais bipiramidais (UFRGS 17-1, 17-2, 17-8, 35-6, 55-1 e 55-3), predominando nos demais isolados formas irregulares. Estes dados diferem dos obtidos por BERNHARD et al. (1997) que, utilizando microscopia eletrônica, verificaram a presença de

crístais bipiramidais em 26% dos isolados obtidos de amostras de solo. O *iBt* médio, variou de 0,09 a 1,0 (Tabela 1), sendo que MARTIN & TRAVERS (1989) e HOSSAIN et al. (1997), obtiveram valores entre 0,44 - 0,77 e 0,02 - 0,85, respectivamente.

Com exceção de Capão Alto e Ulha Negra, nos demais municípios do Rio Grande do Sul foram obtidos isolados de *Bt*.

Em Bom Jesus, Ipê, Igrejinha, Nova Roma do Sul, Nova Santa Rita, Novo Hamburgo, Tavares e Terra de Areia foram obtidas tanto amostras positivas como negativas para *Bt*. Entre as amostras oriundas de outros Estados, apenas na proveniente de Pato Branco (PR) não foi constatada a presença de *Bt*.

Tabela 1 - Características das amostras de solos coletadas em municípios do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, quanto à presença de isolados de *Bacillus thuringiensis*. Porto Alegre, 1999.

PROCEDÊNCIA	Nº DE AMOSTRAS	CB	<i>Bt</i> (%)	<i>iBt</i> (x)	CIP
Antônio Prado (RS)	3	20	45,00	0,61	positivo
Arroio dos Ratos (RS)	1	8	37,50	0,37	positivo
Bento Gonçalves (RS)	2	18	44,45	0,44	positivo
Bom Jesus (RS)	2	25	8,00	0,05	negativo
Caçapava do Sul (RS)	3	12	41,66	0,41	negativo
Cachoeira do Sul (RS)	2	18	33,33	0,41	positivo
Camaquã (RS)	1	7	100,00	1,00	negativo
Campestre da Serra (RS)	3	36	55,55	0,51	positivo
Capão Alto (RS)	2	17	0,00	-	-
Caxias do Sul (RS)	6	32	53,10	0,58	positivo
Concórdia (SC)	1	24	20,83	0,20	negativo
Cristal (RS)	1	8	25,00	0,25	positivo
Cruz Alta (RS)	5	42	30,10	0,29	positivo
Curitiba (PR)	1	11	0,36	0,36	negativo
Curitibanos (SC)	1	15	53,30	0,53	positivo
Dois Lajeados (RS)	1	12	25,00	0,25	negativo
Eldorado Do Sul (RS)	1	7	43,00	0,43	positivo
Encruzilhada do Sul (RS)	1	8	50,00	0,50	positivo
Garibaldi (RS)	1	5	40,00	0,40	positivo
Igrejinha (RS)	3	26	7,00	0,09	negativo
Ipê (RS)	4	36	47,20	0,30	positivo
Jaquirana (RS)	1	12	58,00	0,58	positivo
Linha Nova (RS)	1	8	50,00	0,50	positivo
Morrinhos do Sul (RS)	1	12	41,66	0,41	positivo
Nova Pádua (RS)	1	14	36,00	0,36	negativo
Nova Roma do Sul (RS)	2	33	18,10	0,06	positivo
Nova Santa Rita (RS)	4	57	35,00	0,30	positivo
Novo Hamburgo (RS)	2	22	31,80	0,25	positivo
Passo Fundo (RS)	1	5	60,00	0,60	positivo
Pato Branco (PR)	1	8	0,00	-	-
Porto Alegre (RS)	5	41	63,40	0,62	positivo
Renascença (PR)	1	16	37,00	0,37	positivo
Rio Grande (RS)	1	13	15,00	0,15	positivo
Santa Bárbara do Sul (RS)	1	9	22,00	0,22	negativo
Santa Rosa (RS)	1	10	80,00	0,80	positivo
Santana do Livramento (RS)	1	7	100,00	1,00	negativo
Santo Antônio da Patrulha (RS)	1	8	62,00	0,62	positivo
Sobradinho (RS)	1	10	60,00	0,60	positivo
Taquari (RS)	1	6	16,66	0,16	negativo
Tavares (RS)	3	23	30,40	0,33	positivo
Terra de Areia (RS)	2	17	11,80	0,11	positivo
Tramandaí (RS)	1	17	41,00	0,41	negativo
Tucunduva (RS)	1	5	40,00	0,40	negativo
Ulha Negra (RS)	1	7	0,00	-	-
Vacaria (RS)	2	19	52,60	0,53	positivo
Venâncio Aires (RS)	1	12	33,33	0,33	positivo
Viamão (RS)	1	6	33,33	0,33	positivo
Uruguaiana (RS)	1	3	100,00	1,00	positivo

CB = N° de colônias bacterianas.

Bt (%) = Porcentagem das colônias bacterianas pertencentes à *B. thuringiensis*.

iBt (x) = Índice de *Bt* médio.

CIP = Diferenciação visual da forma dos corpos de inclusões paraesporais (crístais).

A variação do número de colônias bacterianas obtidas entre as amostras (Tabela 1) é provavelmente devida aos diferentes tipos de solos do Rio Grande do Sul, que consistem de 68 unidades de mapeamento. Porém, a ampla ocorrência do *Bt* em praticamente todos os ambientes terrestres, principalmente devido à sua capacidade de sobrevivência em condições adversas e fácil transporte pelo vento, chuva e animais, dificulta comparações entre tipos de solos, especialmente entre regiões geograficamente diferentes, com condições climáticas e solos distintos.

Além disso, o solo constitui um ambiente complexo, influenciado por inúmeros fatores que governam a densidade das populações microbianas. No caso do *Bt*, a sobrevivência dos seus esporos é essencial para sua permanência no solo. A distribuição de seus esporos no solo depende de fatores ecológicos que afetam a sua fecundidade e reciclagem, tanto pelo seu crescimento e multiplicação devido à presença de nutrientes necessários no solo ou pela reintrodução deste patógeno, seja pela imigração de insetos infectados ou pelo transporte pela água e vento (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

Quanto à morfologia das colônias de *Bt*, verificaram-se poucas variações, sendo que a maioria (98,5%) apresentou forma circular e bordos ondulados. Na sua totalidade, as colônias apresentaram-se sem pigmentação, opacas e com estrutura densa. Estes dados estão de acordo com os obtidos por SOSA-GÓMEZ et al. (1998), os quais descreveram as colônias típicas dos bacilos com ausência de pigmentação, bordos ondulados e opacas. Por outro lado, cabe ressaltar que HABIB & ANDRADE (1998) mostraram que os critérios morfológicos não podem ser empregados na diferenciação dos bacilos, indicando assim a necessidade, das etapas adotadas no presente estudo, visando à diferenciação e identificação das espécies e subespécies de *Bacillus*.

Nos testes de patogenicidade, dos 139 isolados testados, somente sete isolados mostraram-se ativos contra *S. frugiperda*, destacando-se UFRGS 68-5 que causou 45,0% de mortalidade, seguido por UFRGS 98-4 com 30,0%. Este último isolado foi caracterizado como *B. thuringiensis aizawai* pela análise sorológica e catalogado como UNI498 no Banco de Bactérias Entomopatogênicas do Instituto Pasteur. Os isolados UFRGS 68-5 e 98-1, conforme os dados de caracterização sorológica correspondem, respectivamente, a *B. thuringiensis silo* e *B. thuringiensis sooncheon*. Para os demais isolados, a mortalidade dos insetos foi inferior a 15% (Tabela 2), para os quais não foi considerada relevante a caracterização das subespécies. A análise dos dados ($F = 2,4955$) mostrou não existir diferença estatística significativa entre os isolados.

Tabela 2 - Atividade de isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidos de amostras de solos para *Spodoptera frugiperda*. Porto Alegre, 1999.

Isolado	Mortalidade corrigida (%)
UFRGS 68-5	45,0
UFRGS 98-4	30,0
UFRGS 98-1	20,0
UFRGS 68-3	15,0
UFRGS 48-2	8,0
UFRGS 68-6	8,0
UFRGS 93-2	5,0

Embora o isolado *Bt aizawai* UNI498, tenha causado 30% de mortalidade para *S. frugiperda*, outros isolados pertencentes à esta subespécie também mostram-se ativos para este inseto, com resultados variáveis. Por exemplo, POLANCZYK (1999), em

condições semelhantes, obteve 15% e 100% de mortalidade para *Bt aizawai* "type I" (W.H.O. Collaborating Centre for Entomopathogenic *Bacillus* of Institut Pasteur) e *Bt aizawai* HD 68 (Plant Genetic Systems), respectivamente. O potencial de *Bt aizawai* para o controle de *S. frugiperda* foi confirmado por SOARES (1996), que cita a utilização de um formulado baseado nesta subespécie, eficaz contra este noctuídeo. Essas variações na especificidade e toxicidade de *Bt aizawai* podem estar diretamente relacionadas as diferentes cepas pertencentes ao mesmo sorotipo H7.

A explicação para a elevada toxicidade de *Bt aizawai* para *S. frugiperda* pode ser a presença das toxinas Cry1B, Cry1D e Cry1F, os quais conferem potencial tóxico significativamente maior que Cry1A (ARANDA et al. 1996, BOHOROVA et al. 1997, LUO et al. 1999). Além disso, CHAK et al. (1994) ressaltam que a ação inseticida dos isolados de *Bt aizawai* para esse noctuídeo pode estar relacionada à interação entre as toxinas Cry1A e Cry1D.

A dificuldade de obtenção de novos isolados de *Bt* eficazes para *S. frugiperda*, constatada neste trabalho, também foi relatada por BOHOROVA et al. (1996). Os autores testaram 352 isolados nativos do México e somente um causou mortalidade entre 70 e 80%, enquanto 149 deles mostraram resultados entre 0 e 10%. HERNANDEZ (1988) testou 52 isolados de *Bt* contra esta espécie alvo e somente dois proporcionaram 100% de mortalidade. Resultados mais promissores foram obtidos por DIAS et al. (1999), que de um total de 23 isolados testados, obtiveram 8 com alto potencial de controle (100% de mortalidade) para *S. frugiperda*.

Devido à complexidade do modo de ação de toxinas de *Bt* vários fatores podem influenciar a virulência deste bioinseticida para espécies-praga. Entre estes destacam-se: inibidor presente no suco gástrico (*S. frugiperda*), estabilidade da protoxina, solubilização dos cristais, processo proteolítico, ausência e alterações dos receptores específicos nas células epiteliais do intestino médio (GARCIA et al. 1982, VAN FRANKENHUYZEN, 1993, FIUZA et al. 1996, PEYRONNET et al. 1997).

Em relação aos receptores, ARANDA et al. (1996) afirmam que em *S. frugiperda* não existe relação entre a capacidade de ligação aos receptores e a toxicidade, considerando ainda que a atuação da proteína é um processo complexo, no qual a ligação com um receptor é uma etapa necessária, mas insuficiente para conferir atividade inseticida.

No entanto, apesar das dificuldades encontradas na seleção de um isolado eficiente, países da América Latina como México e Cuba, além de utilizarem este patógeno contra *S. frugiperda* em várias culturas, também produzem de forma simplificada estes bioinseticidas (GUERRA et al., 2001; PÉREZ & VASQUÉZ, 2001). Esta produção "doméstica" tem efeito direto sobre a utilização deste patógeno pois diminui o custo de controle, estimulando a utilização de bioinseticidas. Estes exemplos mostram a importância e viabilidade deste patógeno, além de estimular pesquisas similares que são realizadas em outros países.

ABSTRACT

The bacterium Bacillus thuringiensis is an important pathogen with high potential to reduce the agriculture chemical usage. In this context, the isolation, identification and screening of new isolates against pests difficult to control, e.g. Spodoptera frugiperda, are essential and important steps to improve the use of this pathogen into the IPM system. From 85 soil samples from Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Paraná states, 772 colonies were obtained, and 371

were identified as *Bacillus* spp. and 293 (78,9%) were described as *B. thuringiensis*. The pathogenicity of 139 *B. thuringiensis* isolates was evaluated using second instar larvae of *S. frugiperda* and seven isolates showed a pathogenic activity (UFRGS 68-5, UFRGS 48-2, UFRGS 68-3, UFRGS 68-6, UFRGS 93-2, UFRGS 98-1 and UFRGS 98-4). UFRGS 68-5 was the most effective with 45% of larvae mortality. Some reasons for the low number of active isolates to this insect species, as well as the identification and the distribution in the soils sampled are discussed.

Key words: biological control, entomopathogen, fall armyworm, bioassays.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.18, p.265-267, 1925.
- AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **Journal of Bacteriology**, Washington, v.177, n.21, p.6027-6032, 1995.
- ALVES, S.B.; MORAES, S.A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: FEALQ: 1998. cap. 23, p.765-778.
- ARANDA, E.; SANCHEZ, J.; PEFEROEN, M. et al. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v.68, p.203-212, 1996.
- BEEGLE, C. B.; YAMAMOTO, T. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **Canadian Entomologist**, Toronto, v.124, p.587-616, 1992.
- BERNHARD, K.; JARRETT, P.; MEADOWS, M. et al. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v.70, p.59-68, 1997.
- BOHOROVA, N.; MACIEL, A. M.; BRITO, R. M. et al. Selection and characterization of mexican strains of *Bacillus thuringiensis* active against four major lepidopteran maize pests. **Entomophaga**, Paris, v.4, p.153-165, 1996.
- BOHOROVA, N.; CABRERA, M.; ABARCA, C. et al. Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI-type insecticidal toxins. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.90, n.2, p.412-415, 1997.
- BOWLING, C. C. Rearing of two lepidopterous pests of rice on a common artificial diet. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v.60, p.1215-1216, 1967.
- CARVALHO, R.P.L. **Danos, flutuação populacional, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e suscetibilidade de diferentes genótipos de milho em condições de campo**. Piracicaba, 1970. 170p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- CHAK, K.F.; CHAO, D.C.; TSENG, M.Y. et al. Determination and distribution of cry-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. **Applied and Environmental Microbiology**, Massachusetts, v.60, p.2415-2420, 1994.
- COPPING, L. G.; MENN, J.J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, London, v.56, p.651-676, 2000.
- CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M.L.C.; VALICENTE F.H. et al. Application rate trials with a nuclear polyhedrosis virus to control *Spodoptera frugiperda* (Smith) on Maize. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.26, p.119-130, 1997.
- CRUZ, I., FIGUEIREDO, M. de L. C.; MATOSO, M. J. **Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma***. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS, 1999. 40p. (Circular Técnica, 30).
- DAMGAARD, P.H. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.23-40.
- De BARJAC, H.; LECADET, M.M. Dosage biochimique de l'exotoxine thermostable de *B. thuringiensis* d'après l'inhibition d'ARN-polymérase bactériennes. **Comptes Rendus de L'academie des Sciences**, Paris, v.282, p.2119-2122, 1976.
- DIAS, S. C.; SAGARDOY, M. A.; SILVA, S. F. et al. Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* isolates from Argentinean soils. **BioControl**, Paris, v.44, p.59-71, 1999.
- FORSYTH, G.; LOGAN, N. A. Isolation of *Bacillus thuringiensis* Northern Victoria Land, Antarctica. **Letters in Applied Microbiology**, v.30, p.263-266, 2000.
- FIUZA, L. M.; LEROUX, N. C.; GOZÉ, E. et al. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry I toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae): Evidence of shared binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, Massachusetts, v.62, p.1544-1549, 1996.
- GARCIA, M. A.; SIMÕES, M.; HABIB, M.E.M. Possible reasons of resistance in larvae of *Spodoptera frugiperda* (Abbot & Smith, 1797) infected by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.57, p.215-222, 1982.
- GASSEN, D, N. **Pragas associadas à cultura do milho**. Passo Fundo, Aldeia Norte, 1994. 92 p.,
- GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley & Sons, 2000. 350 p.
- GUERRA, P.T.; WONG, L.J.G.; ROLDÁN, H.M. et al. Bioinseticidas: su empleo, producción y comercialización en México. **Ciencia UANL**, Ciudad del México, v.4, n.2, p.143-152, 2001.
- HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap.12, p.383-446.
- HANSEN, B.M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis* In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. cap. 3. p.41-64.
- HERNANDEZ, J.L.L. Évaluation de la toxicité de *Bacillus thuringiensis* sur *Spodoptera frugiperda*. **Entomophaga**, Paris, v.32, p.163-171, 1988.
- HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 53, p.242-255, 1989.
- HONGYU, Z.; ZINIU, Y.; WANGXI, D. Isolation, distribution and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from warehouses in China. **Crop Protection**, Amsterdam, v.19, p.449-454, 2000.
- HOSSAIN, M. A.; AHMED, S.; HOQUE S. Abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* in the agricultural soil of Bangladesh. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v.70, p.221-225, 1997.

- JUNG, Y. C.; KIM, S. U.; COTE, J. C. et al. Characterization of a new *Bacillus thuringiensis* subsp. *higo* strain isolated from rice bran in Korea. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v.71, p.95-96, 1998.
- LEIDERMAN, L.; SAUER, H.F.G. A lagarta dos milharais *Laphygma frugiperda* (Abbot e Smith, 1797). **O Biológico**, São Paulo, v.19, n.6, p.105-113, 1953.
- LIMA, J.O.G. de; ZANUNCIO, J.C. Controle da "lagarta do cartucho do milho", *Spodoptera frugiperda*, pelo carbaril, carbofuram, dipel (*Bacillus thuringiensis*) e endossulfam. **Revista Ceres**, Viçosa, v.23, n.127, p.222-225, 1976.
- LUO, K.; BANKS, D.; ADANG, M. Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. **Applied and Environmental Microbiology**, Massachusetts, v.65, n.2, p.457-464, 1999.
- MAEDA, M.; MIZUKI, E.; NAKAMURA, Y. et al. Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. **Current Microbiology**, Washington, v.40, n.6, p.418-422, 2000.
- MARTÍNEZ, C.; CABALLERO, P. Contents of *cry* genes and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.745-752, 2002.
- MARTIN, P.A.; TRAVERS, R.S. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Massachusetts, v.55, n.10, p.2437-2442, 1989.
- PÉREZ, N.; VASQUÉZ, L. L. Manejo ecológico de plagas. In: F. Funes et al. (eds.). **Transformando el campo cubano. Avances de la agricultura sostenible**. La Habana: Cuba, p.191-226. 2001.
- PEYRONNET, O.; VACHON, V.; BROUSSEAU, R. et al. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. **Applied and Environmental Microbiology**, Massachusetts, v.63, n.5, p.1679-1684, 1997.
- POLANCZYK, R.A. **Isolamento e seleção de *Bacillus thuringiensis* Berliner para controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith & Abbot, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**. Porto Alegre, 1999. 65 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- SALEH, S. M.; HARRIS, R. F.; ALLEN, O. N. Method for determining *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner in soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.15, p.1101-1104, 1969.
- SILVA, M. T. B.; RUEDELL, J.; CAMPOS, A. E. Bioecologia e efeito de *Spodoptera frugiperda* (Smith & Abbot, 1797) sobre o rendimento de milho semeado em diversas épocas. In: REUNIÃO ANUAL TÉCNICA DE MILHO, 28., 1983. Porto Alegre, **Ata...** Porto Alegre:UFRGS, 1983. p.227.
- SILVA, S. F. da.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G. **Isolamento, identificação e caracterização entomopatogênica de bacilos de diferentes regiões do Brasil**. Brasília: Embrapa, 2002a. 4 p. (EMBRAPA-Cenargen, Comunicado Técnico, 70).
- SOARES Jr.,G.G. New products and uses arising from mycogen's cellcap® biological encapsulation technology. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6.,1996. Foz de Iguaçu, **Anais...** Foz do Iguaçu: Embrapa-Cobrafi, 1996, p.178-191.
- SOSA-GÓMEZ, D.R.; TIGANO, M.S.; ALVES, S.B. Caracterização de entomopatógenos In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: FEALQ, 1998. cap.22, p.731-764.
- SWIECICKA, I.; FIEDORUK, K.; BEDNARZ, G. The occurrence and properties of *Bacillus thuringiensis* isolated from free-living animals. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, p. 194-198, 2002.
- TRAVERS, R. S., MARTIN, P. A. W.; REICHEFELDER, C. F. Selective process for efficient isolation soil *Bacillus* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.1263-1266, 1987.
- URIBE, D.; MARINEZ, W.; CERÓN, J. Distribution and diversity of *cry* genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.82, p.119-127, 2003.
- VALICENTE, F.H.; PEIXOTO, M.J.V.V.D.; PAIVA, E. et al. Identificação e purificação de um vírus da poliedrose nuclear da lagarta *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Porto Alegre, v.18, s/n, p.71-81, 1989.
- Van FRANKENHUYZEN, K. The Challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S., BAILEY M. et al. ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Willey & Sons, 1993. cap.1, p.1-34.
- WANG, J.; BOETS, A.; VAN RIE, J. et al. Characterization of *cry1*, *cry2* and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.82, p.63-71, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985. **Informal Consultation on the Development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide**. Genebra, UNDP/World Bank/ Who Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Não paginado.
- WISEMAN, B.R.; PAINTER, R.H.; WASSOM, C.E. Detecting corn seedling differences on the greenhouse by visual classification of damage by the fall armyworm. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.59, n.5, p.1211-1214, 1966.
- ZONTA, E.P., MACHADO, A.A. SANEST – **Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Registrado na SEI – Secretaria Especial de Informática, sob n. 066,060, Categoria A. Pelotas, 1984.