

## NOTAS CIENTÍFICAS

### NOVO ISOLADO DE *BACILLUS THURINGIENSIS* EFETIVO CONTRA A LAGARTA-DO-CARTUCHO<sup>1</sup>

JOSEILDE OLIVEIRA SILVA-WERNECK<sup>2</sup>,  
JOSÉ RICARDO DE MORAES VEIGA ABREU NETO<sup>3</sup>,  
ADRIANA NASCIMENTO TOSTES<sup>3</sup>, LÍLIAM OLIVEIRA FARIA<sup>4</sup>  
e JOSÉ MANUEL CABRAL DE SOUSA DIAS<sup>5</sup>

RESUMO - Com o objetivo de encontrar princípios ativos que possam ser usados no controle da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797), foram testados 205 isolados de *Bacillus*, provenientes de diferentes regiões brasileiras, contra larvas deste inseto. Apenas um isolado de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, denominado S93, causou 100% de mortalidade. A  $CL_{50}$  da mistura esporos-cristais do isolado S93 para larvas de 3º estágio de *S. frugiperda* foi de 37,0 ng/mL, enquanto a da estirpe HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolada do produto Dipel foi de 177,73 mg/mL, demonstrando ser o novo isolado muito mais tóxico contra a lagarta-do-cartucho do que HD-1-Dipel.

#### NEW ISOLATE OF *BACILLUS THURINGIENSIS* EFFECTIVE AGAINST THE FALL ARMYWORM

ABSTRACT - Aiming to identify active ingredients that can be used to control the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797), 205 isolates of *Bacillus* from samples of different Brazilian regions were assayed against this insect. Only one isolate of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, designed S93, caused 100% mortality. The  $LC_{50}$  of spores-crystals mixture of S93 against 3<sup>rd</sup> instar larvae of *S. frugiperda* was 37.0 ng/mL, while the  $LC_{50}$  for the strain HD-1 of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, isolated from the product Dipel, was 177.73 mg/mL, showing that this new isolate is much more active against the fall armyworm than the HD-1-Dipel.

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é a principal praga do milho em todas as regiões do

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 8 de abril de 1999.

<sup>2</sup> Eng. Agrôn., M.Sc., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Caixa Postal 02372, CEP 70849-970 Brasília, DF. E-mail: joseilde@cenargen.embrapa.br

<sup>3</sup> Estudante de Biologia, estagiário, Embrapa-Cenargen.

<sup>4</sup> Eng. Agrôn., Embrapa-Cenargen. Bolsista do CNPq.

<sup>5</sup> Eng. Químico, Ph.D., Embrapa-Cenargen.

Brasil (Ferraz, 1991), e uma das principais pragas desta cultura na América do Sul, América Central e México (Embrapa, 1997). Ocorre durante todos os estádios de desenvolvimento da cultura, ataca o cartucho e as folhas, podendo destruí-los completamente, e causa perdas de 15% a 37% na produtividade (Embrapa, 1997).

*Bacillus thuringiensis* Berliner é uma bactéria gram-positiva que durante o processo de esporulação produz inclusões cristalinas, compostas por  $\delta$ -endotoxinas ou proteínas-cristal, tóxicas para larvas de insetos e altamente específicas na sua atividade, e que não causam danos a insetos não-alvo, a vertebrados e ao meio ambiente (Krieg & Langenbruch, 1981; Hofte & Whiteley, 1989). Bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* vêm sendo utilizados há mais de 40 anos no controle de lepidópteros, e, mais recentemente, no controle de dípteros e coleópteros (Dias, 1992; Feitelson et al., 1992). A maioria dos produtos de *B. thuringiensis* usada para controlar lepidópteros-praga é baseada na mistura esporos-cristais, produzida pela estirpe HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, a qual tem amplo espectro de atividade larvicida dentro da ordem Lepidoptera (Navon, 1993). Entretanto, insetos pertencentes à família Noctuidae, a qual inclui as diversas espécies de *Spodoptera*, são pouco sensíveis a esses produtos (Moar et al., 1990; Inagaki et al., 1992; Navon, 1993; Lambert et al., 1996).

Visando identificar isolados desta bactéria que possam ser utilizados no controle biológico de *S. frugiperda*, foi feita seleção entre 205 isolados de *Bacillus* sp. de diversas regiões do Brasil (65 da Região Norte, 10 da Região Nordeste, 40 da Região Centro-Oeste, 60 da Região Sudeste e 30 da Região Sul), isolados conforme recomendações da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 1985) e armazenados no Banco de Germoplasma Microbiano da Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen).

Os isolados foram cultivados em meio caldo nutritivo (8 g/L de caldo nutritivo; 1 g/L de extrato de levedura; 1 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,1 g/L de  $\text{CaCO}_3$ ; 0,1 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 g/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 g/L de  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), em incubador rotativo a 30°C e 200 rpm, até completa esporulação, avaliada por microscopia de contraste de fase. Nos testes de patogenicidade para larvas de 3º estágio de *S. frugiperda*, foram usados 50  $\mu\text{L}$  de cada suspensão bacteriana sobre dieta artificial para *S. frugiperda*, à base de feijão-carioca, levedo de cerveja e gérmen de trigo. Foram feitas dez repetições por tratamento (isolado testado) e da testemunha (sem bacilo). A avaliação da mortalidade foi feita de dois em dois dias até o oitavo dia. Um isolado selecionado nos bioensaios realizados foi submetido a caracterização sorológica de acordo com metodologia de Dias et al. (1993).

Para cálculo da  $\text{CL}_{50}$  (concentração que mata 50% da população tratada) para larvas de *S. frugiperda*, suspensões diluídas preparadas a partir de

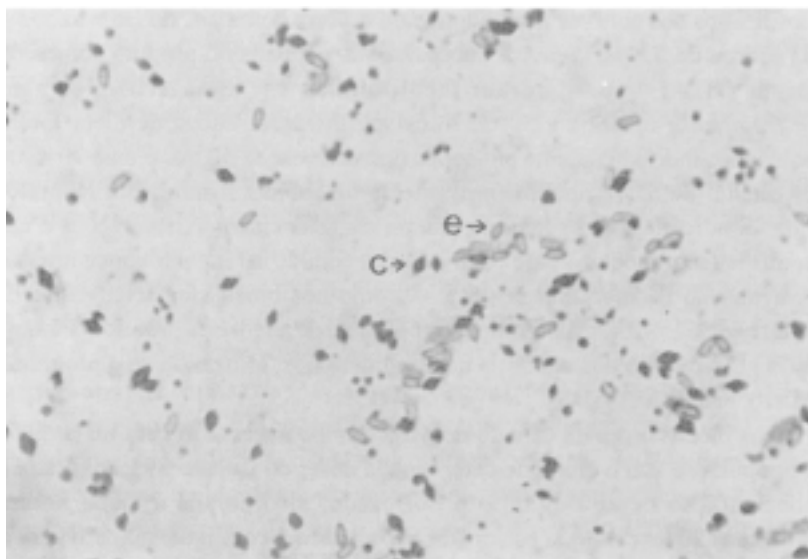
lioofilizados dos cultivos finais, contendo esporos e cristais, do isolado S93 e da estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolada do produto comercial Dipel (HD-1-Dipel), foram incorporadas em dieta artificial para *S. frugiperda* mantida a 50°C. Após solidificação, cubos de dieta foram colocados individualmente em copos descartáveis de 50 mL e uma larva de 3<sup>o</sup> estágio de *S. frugiperda* (proveniente de colônia mantida em laboratório) foi adicionada a cada copo. Foram testadas cinco concentrações e um controle (sem inóculo) para cada isolado, com 20 larvas por concentração. A avaliação da mortalidade foi feita como nos bioensaios seletivos, e os valores de CL<sub>50</sub> foram determinados por meio de análise de próbitos (Finney, 1971) das médias dos dados de quatro bioensaios, utilizando-se o programa Micro Probit.

Nos bioensaios para cálculo do TL<sub>50</sub> (tempo necessário para matar 50% da população sob o efeito de determinada dose) do isolado S93, foi usada a concentração de 200 ng/mL do liofilizado, incorporada à dieta. Foram utilizadas 20 larvas de 3<sup>o</sup> estágio de *S. frugiperda*, com igual número para o controle, e a avaliação de mortalidade foi feita de seis em seis horas, até a morte da última larva tratada.

Para análise das proteínas, as preparações das misturas esporos-cristais dos isolados S93 e HD-1-Dipel, obtidas conforme Souza et al. (1993), foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 10,5%, conforme descrito por Laemmli (1970).

Entre os isolados de *Bacillus* testados por meio de bioensaios seletivos, apenas um causou 100% de mortalidade de larvas de *S. frugiperda*. Esse isolado, proveniente de amostra de solo de Uberlândia (MG) e denominado S93, foi sorologicamente caracterizado como *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (H3a:3b), e produzia muitos cristais protéicos bipiramidais visíveis ao microscópio óptico sob contraste de fase, ou após coloração por amido black (Fig. 1). Essa morfologia de cristais é típica de proteínas da classe CryI, as quais apresentam atividade contra lepidópteros (Höfte & Whiteley, 1989).

As CL<sub>50</sub> foram obtidas a partir de quatro bioensaios realizados em dias diferentes. A Tabela 1 apresenta os resultados das médias dos bioensaios. O isolado S93 mostrou-se cerca de 4.800 vezes mais tóxico para larvas de 3<sup>o</sup> estágio de *S. frugiperda* do que HD-1-Dipel. Relatos a respeito da susceptibilidade de *S. frugiperda* a toxinas de *B. thuringiensis* indicam que essa espécie apresenta baixa susceptibilidade aos produtos à base de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* estirpe HD-1, utilizados para o controle de lepidópteros (Morales & Novoa, 1992; Bohorova et al., 1996; Nyouki et al., 1996). Aranda et al. (1996) afirmaram que uma das proteínas produzidas pela estirpe HD-1 (toxina CryIA(b)) não é tóxica para *S. frugiperda*. Entretanto, Aronson (1995) relatou que a presença da protoxina CryIA(b) é importante para a solubilidade das inclusões protéicas produzidas por uma estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* e sua conseqüente toxicidade para *S. frugiperda*.



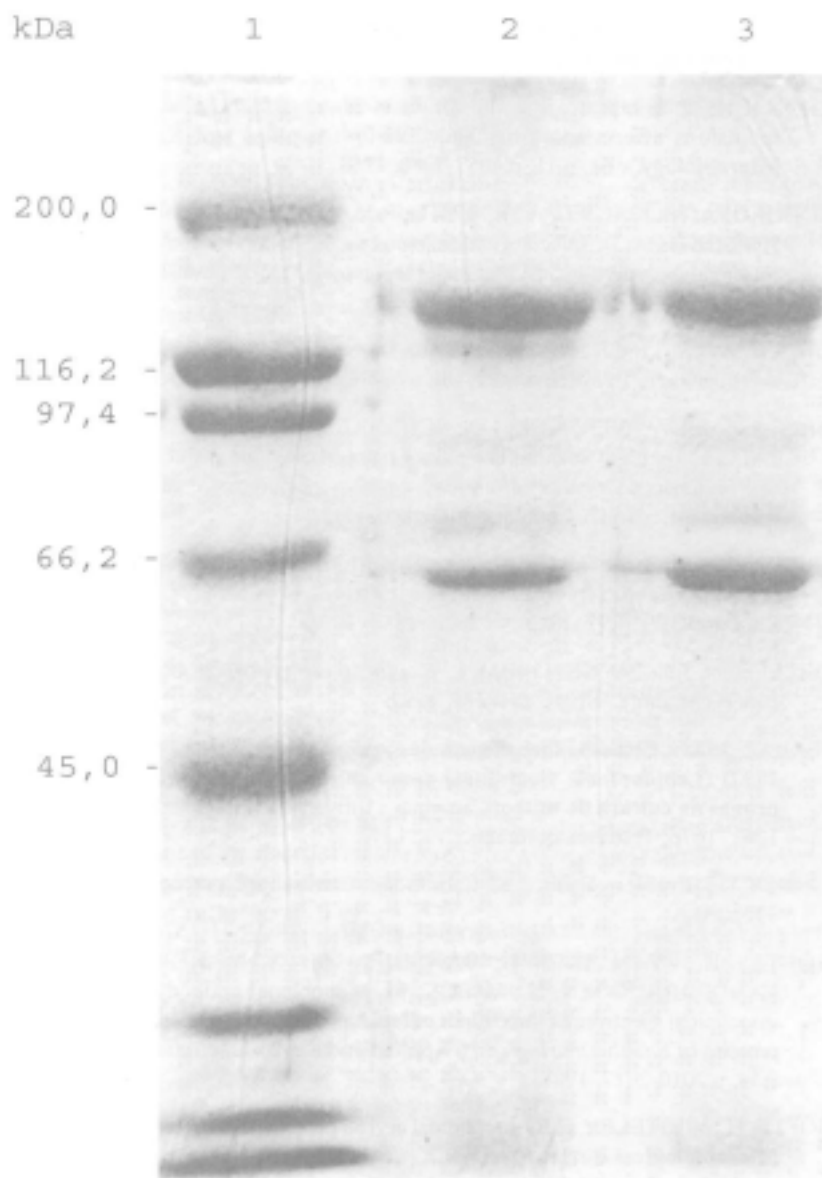
**FIG. 1.** Esporos (e) e cristais bipiramidais (c) do isolado S93 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, após coloração por amido black, sob aumento de 1000 X.

**TABELA 1.** Toxicidade de liofilizados preparados a partir de culturas esporuladas dos isolados S93 e HD-1-Dipel de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* para larvas de 3º estágio de *Spodoptera frugiperda*.

Isolado	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	Intervalo de confiança (95%)
HD-1-Dipel	177,730	83,717 - 463,401
S93	0,037	0,009 - 0,102

Foi obtido o TL<sub>50</sub> de 49,7 horas para o isolado S93, o que indica ação relativamente rápida do patógeno sobre o hospedeiro, mesmo em concentração que pode ser considerada baixa, tendo em vista a pequena sensibilidade do inseto à estirpe HD-1 padrão de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

A caracterização eletroforética das proteínas nas misturas esporos-cristais mostrou a presença de dois polipeptídeos principais de aproximadamente 130 e 65 KDa nos dois isolados (Fig. 2), perfil que corresponde ao descrito na literatura para HD-1 (Höfte et al., 1988, Lereclus et al., 1993). As massas moleculares podem ser relacionadas a proteínas-cristal das classes CryI e CryII, respectivamente (Höfte & Whiteley, 1989; Lereclus et al., 1993).



**FIG. 2.** Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 10,5% de misturas esporos-cristais dos isolados S93 e HD-1-Dipel de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. 1- Marcador de massa molecular (Broad molecular weight standards- Bio Rad); 2 - HD-1-Dipel; 3 - S93.

#### REFERÊNCIAS

- ARANDA, E.; SANCHEZ, J.; PEFEROEN, M.; GÜERECÁ, L.; BRAVO, A.  
Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial

- cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.68, p.203-212, 1996.
- ARONSON, A. The protoxin composition of *Bacillus thuringiensis* insecticidal inclusions affects solubility and toxicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.11, p.4057-4060, 1995.
- BOHOROVA, N.; MACIEL, A.M.; BRITO, R.M.; AGUILART, L.; IBARRA, J.E.; HOISINGTON, D. Selection and characterization of mexican strains of *Bacillus thuringiensis* active against four major lepidopteran maize pests. **Entomophaga**, v.41, n.2, p.153-165, 1996.
- DIAS, J.M.C.S. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, s/n, p.59-76, 1992. Edição especial.
- DIAS, S.C.; SILVA-WERNECK, J.O.; SCHENKEL, R.G.M.; LOPES, J.B.; DIAS, J.M.C.S. **Técnicas sorológicas para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus***. Brasília : Embrapa-Cenargen, 1993. 6p. (Embrapa-Cenargen. Comunicado técnico, 15).
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG). **Recomendações técnicas para o cultivo do milho**. 2.ed. Brasília : Embrapa-SPI, 1997. 204p.
- FEITELSON, J.S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/Technology**, v.10, p.271-275, 1992.
- FERRAZ, J.M.G. **Estudos bioecológicos de *Spodoptera frugiperda* (Abbot e Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) como subsídio ao manejo integrado de pragas na cultura do milho**. Campinas : Universidade Estadual de Campinas, 1991. 167p. Tese de Doutorado.
- FINNEY, D.J. **Probit analysis**. 3.ed. Cambridge : Cambridge University Press, 1971. 333p.
- HÖFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; VAN HOUTVEN, A.; VANDERBRUGGEN, H.; VAECK, M. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2010-2017, 1988.
- HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v.53, n.2, p.242-255, 1989.
- INAGAKI, S.; MIYASONO, M.; ISHIGURO, T.; TAKEDA, R.; HAYASHI, Y. Proteolytic processing of  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 in insensitive insect, *Spodoptera litura*: unusual proteolysis in the presence of sodium dodecyl sulfate. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.60, p.64-68, 1992.
- KRIEG, A.; LANGENBRUCH, G.A. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In: BURGESS, H.D. (Ed.). **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. London : Academic, 1981. p.837-896.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.

- LAMBERT, B.; BUYSSE, L.; DECOCK, C.; JANSSENS, S.; PIENS, C.; SAEY, B.; SEURINCK, J.; VAN AUDENHOVE, K.; VAN RIE, J.; VAN VLIET, A.; PEFEROEN, M. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.1, p.80-86, 1996.
- LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M.M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S. (Eds.). **Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester : John Wiley & Sons, 1993. p.37-69.
- MOAR, W.J.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R.; TRUMBLE, J.T. Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual P1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.8, p.2480-2483, 1990.
- MORALES, G.G.; NOVOA, A.S. Selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* para control de insectos lepidópteros. **Southwestern Entomologist**, v.17, n.1, p.63-67, 1992.
- NAVON, A. Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S. (Eds.). **Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester : John Wiley & Sons, 1993. p.125-146.
- NYOUKI, F.F.R.; FUXA, J.R.; RICHTER, A.R. Spore-toxin interactions and sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomological Science**, v.31, n.1, p.52-62, 1996.
- SOUZA, M.T. de; LECADET, M.M.; LERECLUS, D. Full expression of the CryIIIa toxin gene of *Bacillus thuringiensis* requires a distant upstream DNA sequence affecting transcription. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.10, p.2952-2960, 1993.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide**. Geneve, 1985. 24p.