

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

LUCIANO NAZARETH SILVA

**ISOLAMENTO DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER EM  
AMOSTRAS DE SOLO DO SUL DO ESTADO DO ESPIRITO SANTO  
E SELEÇÃO A *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA:  
NOCTUIDAE)**

**ALEGRE  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



LUCIANO NAZARETH SILVA

**ISOLAMENTO DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER EM  
AMOSTRAS DE SOLO DO SUL DO ESTADO DO ESPIRITO SANTO  
E SELEÇÃO A *Anticarsia gemmatilis* (LEPIDOPTERA:  
NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk

Co-orientadores: Prof. Dr. Dirceu Pratissoli

Prof. Dr. Waldir Cintra de Jesus Jr.

**ALEGRE  
2008**



**LUCIANO NAZARETH SILVA**

**ISOLAMENTO DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER EM  
AMOSTRAS DE SOLO DO SUL DO ESTADO DO ESPIRITO SANTO  
E SELEÇÃO A *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA:  
NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em: \_\_\_\_\_

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk  
Centro de Ciências Agrárias – UFES  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Dirceu Pratisoli  
Centro de Ciências Agrárias – UFES  
(Co-Orientador)

---

Prof. Dr. Waldir Cintra de Jesus Junior  
Centro de Ciências Agrárias – UFES  
(Co-Orientador)

---

Prof. Dr. Cláudio Roberto Franco  
Centro de Ciências Agrárias - UFES

---

Prof. Dr. Anderson Mathias Holtz  
Escola Agrotécnica Federal de Colatina

## **DEDICO**

Aos meus pais, Luci Nazareth Silva e Onofre Aquino da Silva, os quais sempre me ensinaram o caminho onde deveria andar, e mesmo que distantes nunca deixaram de acreditar, e através da experiência de vida e palavras de sabedoria, tornaram-me forte e persistente, permitindo mais esta conquista.

A minha irmã, Patrícia Nazareth Silva, e aos meus familiares, por todo apoio e incentivo, pela amizade, carinho em todas as etapas da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me concedido as forças necessárias, a perseverança e a fé para realização e concretização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Ricardo Antônio Polanczyk, pela orientação das pesquisas, compreensão, pelos valiosos conselhos e ensinamentos, decisivos na realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Dirceu Pratissoli pela co-orientação, confiança, ensinamentos transmitidos durante o curso, e sugestões apresentadas na dissertação.

Ao Professor Dr. Waldir Cintra de Jesus Junior pela co-orientação, incentivo e sugestões apresentadas na dissertação.

Ao Professor Dr. Anderson Mathias Holtz e ao Dr. Cláudio Roberto Franco por aceitarem participar desta banca.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal (PPGPV) do CCA-UFES, pela oportunidade concedida.

À secretaria da Pós-Graduação, Madalena Caetano Capucho de Oliveira, pela atenção, informações e trabalhos prestados.

Ao Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES/Alegre – ES) pela utilização do laboratório.

Ao Laboratório de Solos do CCA-UFES – Alegre e ao Núcleo de Difusão de Tecnologia em Floresta, Recursos Hídricos e Agricultura Sustentável (NEDTEC) - Jerônimo Monteiro – ES pela liberação das amostras de solos.

Ao Professor Dr. Fábio Ramos Alves pela amizade e incentivo durante o curso.

Ao amigo e MSc. Eng. Agrônomo Hugo J. G. S. Junior por ter repassado sua experiência com entomopatógenos.

Ao amigo Eng. Agrônomo Eduardo Domingos Grecco pelo auxílio durante o experimento e amizade.

Ao amigo Eng. Agrônomo Geraldo Siemon pelo auxílio prestado tanto nas disciplinas que cursamos juntos quanto pelas constantes idéias trocadas.

Aos colegas de mestrado da Pós-Graduação em Produção Vegetal do CCA-UFES, pela convivência agradável em especial a Regina Gonçalves dos Santos e Leandro Pin Dalvi.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Entomologia que participaram direta ou indiretamente na condução deste trabalho, em especial a Luziane Rezende Bestete, João Rafael, Leonardo Mardgan e Maria Carlota Moraes (Tia Carlota).

Aos meus amigos de Alegre (ES) que sempre estiveram ao meu lado nos momentos bons e difíceis de minha vida.

A todos aqueles que de uma forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho de pesquisa, fica registrada a minha gratidão.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de isolados de *Bacillus thuringiensis* (Bt) em solos do Espírito Santo, analisando a distribuição e diversidade deste patógeno em diferentes ecossistemas do Estado e testar sua patogenicidade para *Anticarsia gemmatalis*. A partir de 19 amostras de solos foram isoladas 165 colônias bacterianas, sendo que destas 76 foram identificadas como Bt. A relação entre o número de colônias bacterianas e as de Bt (iBt), variou de 0,13 a 0,76. Foi possível identificar a forma do cristal em 72,4% dos isolados obtidos, sendo o formato bipiramidal predominante (65,45%). Dentre os 14 isolados de Bt testados para o controle da lagarta-da-soja, Nudemafi 02 e 07 são os mais promissores para o controle desta praga, causando 100% de mortalidade em lagartas de primeiro instar, sendo equivalente à estirpe padrão utilizado, *Bacillus thuringiensis kurstaki* (HD-1).

**Palavras-chave:** Controle biológico. Entomopatógeno. Bactéria. Inseto.

## ABSTRACT

The objective of this work was to isolate *Bacillus thuringiensis* (Bt) from soil samples of the Espírito Santo, analyzing the distribution and diversity of this pathogen in different ecosystems of the state and to evaluate its toxicity against *Anticarsia gemmatalis*. From 19 soil samples about 165 bacterial colonies have been isolated, and 76 were identified as Bt. The relation between the total number of bacterial colonies and those that belonged to Bt group (iBt), varied from 0,13 to 0,76. The bipiramidal shape was the most common 65,45% in those isolates that it was possible to identify the crystal shape (72,4%). Among 14 isolates assayed against *A. gemmatalis*, the Nudemafi 02 and 07 were the most effective for the control of pest, causing 100% of mortality to first instar larvae, equivalent to that caused by the used *Bacillus thuringiensis kurstaki* (HD-1).

**Key words:** Biological control. Entomopathogen. Bacterial. Insect.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Inclusões protéicas cristalinas de *Bacillus thuringiensis* definidas por microscopia eletrônica. .... 17
- Figura 2 - Procedimento básico para elaboração de uma coleção de entomopatógenos descritos por Alves et al. (1998). .... 26
- Figura 3 - Distribuição dos Municípios do Espírito Santo onde foram coletadas amostras de solo. Alegre, ES. .... 44
- Figura 4 - Isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidos de amostras de solos, em microscopia de contraste de fase (1.000x), corados com a técnica de gram. Bastonetes (b), cristais (c) e esporos (e)..... 46

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidos de amostras de solos no Estado do Espírito Santo, 2008. .... 45
- Tabela 2 - Distribuição por municípios de *Bacillus thuringiensis* em amostras de solos. .... 48
- Tabela 3 - Mortalidade (%) ( $\pm$  Erro Padrão) de *Anticarsia gemmatalis* (Lep.:Noctuidae) inoculadas em dieta artificial contendo suspensão suspensão de isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidos a partir de amostras de solos a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , U.R  $70\% \pm 5$  e fotofase 12 h, Alegre, ES; 2008. .... 55

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 MICRORGANISMOS DO SOLO E CONTROLE BIOLÓGICO .....	14
2.2 CONTROLE MICROBIANO: BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS .....	15
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> BERLINER (Bt).....	16
<b>2.3.1 TOXINAS PRODUZIDAS POR <i>Bt</i></b> .....	18
<b>2.3.2 MECANISMOS DE AÇÃO DAS PROTEÍNAS Cry E CARACTERIZAÇÃO DE <i>Bt</i></b> .....	19
<b>2.3.3 UTILIZAÇÃO DE <i>Bt</i> NA AGRICULTURA</b> .....	22
2.4 ISOLAMENTO DE ENTOMOPATÓGENOS.....	24
<b>2.4.1 MÉTODOS DE COLORAÇÃO DE BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS</b> .....	26
<b>2.4.2 ISOLAMENTO DE <i>Bt</i> A PARTIR DE AMOSTRAS DE SOLO</b> .....	27
2.5 <i>Anticarsia gemmatalis</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) .....	29
<b>2.5.1 DESCRIÇÃO E BIOLOGIA</b> .....	29
<b>2.5.2 PREJUÍZOS CAUSADOS POR <i>A. gemmatalis</i></b> .....	31
<b>2.5.3 CONTROLE DE <i>A. gemmatalis</i></b> .....	32
<b>2.5.4 CONTROLE QUÍMICO</b> .....	33
<b>2.5.5 CONTROLE BIOLÓGICO</b> .....	34
<b>2.5.6 ATIVIDADE DE <i>Bt</i> PARA <i>A. gemmatalis</i></b> .....	35
<b>3. ISOLAMENTO DE <i>Bacillus thuringiensis</i> E PATOGENICIDADE PARA <i>Anticarsia gemmatalis</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)</b> .....	37
<b>RESUMO</b> .....	37
<b>ABSTRACT</b> .....	38
3.1 INTRODUÇÃO .....	39
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	41
<b>3.2.1 CRIAÇÃO EM LABORATÓRIO DE <i>A. gemmatalis</i></b> .....	41
<b>3.2.2 ORIGEM DOS ISOLADOS</b> .....	41
<b>3.2.3 ISOLAMENTO DE <i>Bt</i> DE AMOSTRAS DE SOLO</b> .....	41

<b>3.2.4 MULTIPLICAÇÃO DOS ISOLADOS</b> .....	42
<b>3.2.5 TESTE DE PATOGENICIDADE</b> .....	43
<b>3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
<b>3.3.1 ISOLAMENTO DE Bt DE AMOSTRAS DE SOLOS</b> .....	44
<b>3.3.2 TESTE DE PATOGENICIDADE</b> .....	54
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	59
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	60



## 1. INTRODUÇÃO

É comum em trabalhos sobre biodiversidade e extinção de espécies, abordar sobre espécies vegetais e animais que vivem acima do solo. As comunidades de organismos micro e macroscópicos que habitam o solo, por não estarem visíveis aos olhos humanos, raramente são mencionados e por isso são geralmente negligenciadas. No entanto, essas comunidades “invisíveis”, principalmente os microrganismos, realizam atividades imprescindíveis como ciclagem de carbono e outros elementos, fixação biológica do nitrogênio atmosférico, desnitrificação, redução do sulfato, produção de metano, biotransformação de metais, degradação de produtos vegetais e controle biológico de pragas e doenças.

No Brasil, assim como em outros países, o desequilíbrio biológico, causado pelo uso indiscriminado de produtos fitossanitários na busca dos agricultores por maiores lucros, provavelmente, é o principal fator que contribui para o aumento do número de espécies-praga e seus níveis populacionais, além dos efeitos indesejáveis dos mesmos sobre o ambiente, o homem e os animais. Devido a estes problemas, a busca por métodos alternativos de controle tem sido realizada insistentemente em várias instituições de pesquisa, ensino e extensão. Neste sentido, agentes de controle biológico são uma importante estratégia que através da liberação, incremento e conservação de insetos parasitóides, predadores e microrganismos, impedem que insetos-praga atinjam níveis populacionais capazes de causar dano econômico.

Entre os microrganismos com potencial empregados no controle dos insetos-praga, destaca-se o entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner, 1915. Naturalmente encontrada no solo, esta bactéria caracteriza-se pela produção de inclusões protéicas cristalinas que são tóxicas a larvas de insetos, especialmente lepidópteros. Este patógeno pode se multiplicar em microhabitats favoráveis como, por exemplo, amostras de solo e água, superfície de plantas, insetos-alvo, grãos armazenados.

O isolamento de Bt a partir de diversos substratos fornece subsídios para os estudos de dinâmica populacional e ecologia dos microrganismos no ambiente em que se

encontram, permite o conhecimento da presença e diversidade dos agentes de controle microbiano no ambiente e o impacto dos tratamentos culturais sobre tais populações, além de garantir a formação de bancos ou coleções de patógenos com finalidades didáticas e, principalmente, científicas, pois, dentre a vasta quantidade de patógenos existentes, muitos são promissores para ser empregados de forma aplicada em programas de controle biológico de pragas e vetores de doenças.

Noctuidae constitui a família de Lepidoptera mais diversa por ser ecologicamente bem sucedida, com grande número de espécies que se alimentam de plantas cultivadas, sendo consideradas pragas de extrema importância econômica, como *Agrotis* spp., *Spodoptera* spp., *Heliothis* spp. e *Anticarsia* spp. Dentre o complexo de lagartas de normal ocorrência na cultura da soja (*Glicine max*) destaca-se a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*), bastante conhecida dos produtores e sendo a maior causadora de desfolha na cultura. O uso de Bt para o controle dessa importante praga-chave é considerado como uma alternativa eficiente, porém necessitando mais estudos com o intuito de descobrir novos isolados para um melhor controle populacional da lagarta.

Neste trabalho objetivou-se, isolar Bt de amostras de solos do Espírito Santo, fornecendo indícios sobre a distribuição e diversidade deste patógeno em diferentes agroecossistemas do Estado e testar sua patogenicidade para *A. gemmatalis*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Microorganismos do solo e controle biológico

Sempre se refere às espécies vegetais e animais que vivem acima do solo quando se fala em biodiversidade e extinção de espécies. As comunidades de organismos micro e macroscópicos que habitam o solo, por não estarem visíveis aos olhos humanos, raramente são mencionados e por isso são geralmente negligenciadas. No entanto, essas comunidades “invisíveis”, principalmente os microorganismos, realizam atividades imprescindíveis para a manutenção e sobrevivência das comunidades vegetais e animais.

No solo, as atividades principais dos organismos são: decomposição da matéria orgânica, produção de húmus, ciclagem de nutrientes e energia, fixação de nitrogênio atmosférico, produção de compostos complexos que causam agregação do solo, decomposição de xenobióticos e controle biológico de pragas e doenças (RECHE ; FIUZA, 2005).

O desequilíbrio biológico, causado pelo uso indiscriminado de agrotóxicos, provavelmente, é o principal fator que contribui para o aumento populacional de insetos-praga e a redução da produtividade, além dos efeitos indesejáveis dos mesmos sobre o ambiente, o homem e os animais.

Os insetos constituem uma das principais causas de danos à produção agrícola, sendo estas perdas da ordem de 20 a 30% da produção mundial. Estima-se que cerca de 67.000 espécies de insetos causem danos às plantações sendo as regiões tropicais, as que mais sofrem com a alta incidência de insetos-pragas (HERRERA - ESTRELLA, 1999). Os métodos convencionais de proteção das culturas estão baseados no uso de agroquímicos, que podem ser tóxicos quando usados indevidamente, este problema está aumentando devido à seleção de resistência dos insetos a alguns agrotóxicos (BRAVO et al., 1998).

A busca por métodos alternativos de controle de insetos-praga tem sido realizada com afincos por laboratórios ao redor do mundo, devido à necessidade de uma

agricultura mais sustentável e desenvolvida com uma maior preocupação com a preservação do meio ambiente (BOBROWSKI et al., 2003; ALVES ; LOPES, 2008). Neste sentido o controle biológico utiliza meios naturais para diminuir a população de organismos considerados praga, em geral insetos, que causam danos econômicos às lavouras. O controle pode ser feito por outro organismo (predador, parasitóide ou patógeno) que ataca a praga, podendo ser muito eficiente no seu controle e tendo como principal característica não causar danos acumulativos a lavoura ou aos inimigos naturais do alvo do controle.

## **2.2 Controle Microbiano: Bactérias entomopatogênicas**

O controle microbiano é um ramo do controle biológico e visa à utilização de entomopatógenos (bactérias, fungos, vírus, protozoários, nematóides) no controle de insetos-praga. É importante salientar que os entomopatógenos devem fazer parte de um conjunto de medidas que atuando em harmonia com o ambiente, sejam capazes de reduzir a população e os efeitos do inseto-praga na agricultura (ALVES ; LOPES, 2008).

As doenças bacterianas em insetos benéficos começaram a ser descobertas antes das doenças de insetos prejudiciais. No final do século XIX, a apicultura e a sericicultura eram severamente ameaçadas por doenças, até então desconhecidas estimulando investigações que visavam a determinação da causa da morte e de práticas para salvar criações de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) e de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Tais investigações serviram como base fundamental para pesquisas posteriores em patologia e controle microbiano de insetos prejudiciais (HABIB ; ANDRADE, 1998).

Embora sejam conhecidas centenas de espécies de bactérias associadas a insetos são poucas aquelas que possuem características que permitem o seu uso no controle de insetos prejudiciais. As espécies entomopatogênicas de maior importância concentram-se nas famílias Enterobacteriaceae e Bacillaceae, além de alguns gêneros da ordem Pseudomonadales (HABIB ; ANDRADE, 1998). Tratando desses grupos mencionados St. JULIAN et al. (1973) e ANGUS (1974) citados por

HABIB ; ANDRADE (1998), salientam a inadequação das bactérias não esporulantes para o uso no controle de insetos, devido à sua alta sensibilidade às radiações e às condições climáticas, dificultando o seu manuseio, além de grande parte ser considerada patogênica para vertebrados.

FALCON (1971) agrupou as bactérias entomopatogênicas em apenas duas categorias: esporulantes (cristalíferas e não cristalíferas) e não esporulantes. Do ponto de vista da patologia de insetos, acredita-se que os critérios desse autor sejam os mais viáveis.

Embora sejam poucas as espécies de bactérias com alta capacidade de invadir a parede intestinal e se multiplicar no intestino dos insetos, várias espécies são consideradas potenciais, ou seja, com a capacidade de se multiplicar na hemolinfa, causando septicemias fatais, no qual levou o homem a pesquisar mais profundamente as bactérias esporulantes para o controle de insetos prejudiciais. *Bacillus* spp. são representadas por células em forma de bastonetes, às vezes em cadeia, a maioria capaz de produzir endósporo. Apesar da significativa variação entre as diferentes espécies desse gênero, várias características, como formação de esporos e a produção de toxinas e enzimas, levaram os patógenos pertencentes a ele a um lugar privilegiado entre os agentes altamente promissores no controle de insetos prejudiciais (HABIB ; ANDRADE, 1998; POLANCZYK et al., 2008).

### **2.3 *Bacillus thuringiensis* BERLINER (Bt).**

Dentre as bactérias entomopatogênicas atualmente conhecidas, somente as do gênero *Bacillus* spp. (Bacillaceae), são utilizadas em larga escala no controle biológico de insetos, destacando-se o entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* (Bt) com potencial para serem utilizados no controle de insetos-praga (POLANCZYK et al., 2008).

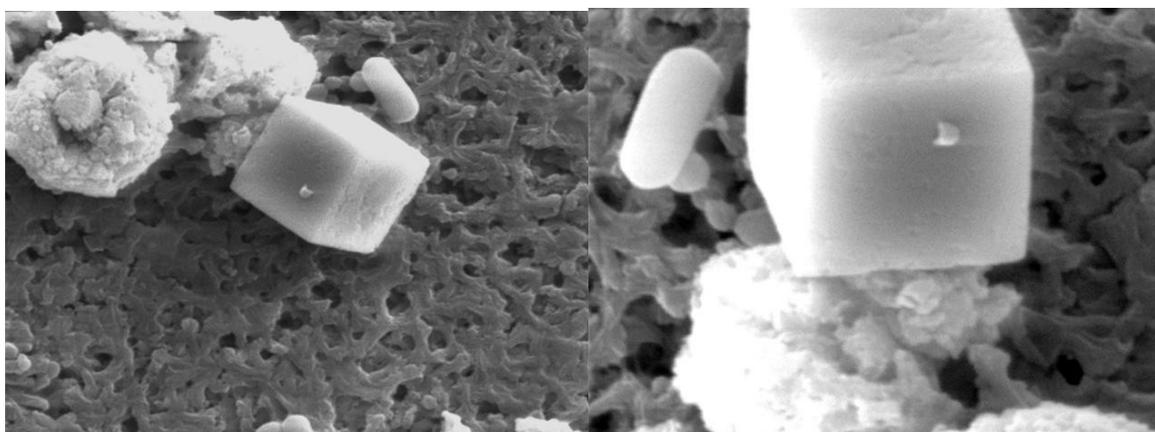
O Bt é uma bactéria em forma de bastonete, de 1 a 1,2 de diâmetro por 3 a 5 µm, geralmente com motilidade, positiva para coloração de gram, aeróbica ou facultativamente anaeróbica, naturalmente encontrada no solo (BOBROWSKI et al., 2003). No momento de sua esporulação, caracteriza-se pela produção, de inclusões

protéicas cristalinas. Estas inclusões se distinguem como cristais de formas definidas por microscopia de contraste de fases (MONNERAT ; BRAVO, 2000) (Figura 1).

Estes cristais são compostos por uma ou várias proteínas Cry, também denominadas de  $\delta$ -endotoxinas ou “Insecticidal Crystal Proteins” (ICPs). Essas proteínas são altamente tóxicas e específicas; não poluem o meio ambiente, são inócuas a mamíferos e vertebrados, e não são tóxicas às plantas (WHITELEY ; SCHNEPF, 1986; BRAVO et al., 1998; HERRERO et al., 2001; SIEGEL, 2001; MONNERAT et al., 2004).

O primeiro isolamento deste patógeno foi realizado por Ishiwata, em 1901 e 1902, quando isolou um bacilo patogênico de larvas de *Bombyx mori* (bicho-da-seda) , dando-lhe o nome de “*sotto disease bacillus*”. Mas BERLINER (1911) isolou um bacilo, causando doença e morte em larvas de *Anagasta Kuehniella* Zeller. Além da compreensão de alguns aspectos de patogenicidade, a bactéria foi descrita e denominada *Bacillus thuringiensis* por BERLINER (1915), em homenagem à província da Thuringia (Alemanha), onde o primeiro inseto infectado foi encontrado (ALVES, 1998).

As formulações de produtos microbianos existentes no mercado possuem como princípio ativo diversas espécies e variedades de *Bacillus* (50%), sendo que 90% do faturamento com estes produtos e devido a presença do Bt como princípio ativo desses formulados (ALVES et al., 1998; POLANCZYK et al., 2008).



**Figura 1** – Inclusões proteicas cristalinas cubóides de *Bacillus thuringiensis* definidas por microscopia eletrônica. Fonte: Fernando Hercos Valicente

### 2.3.1 Toxinas produzidas por Bt

Existem várias toxinas produzidas por variedades de Bt já caracterizadas, além de outras substâncias de ação inseticida pouco definida pra muitas espécies de insetos.

A  $\alpha$ -exotoxina, também conhecida como fosfolipase C ou fosfatidilcolina fosfolipase, é uma enzima que possui atividade citolítica, é solúvel em água, termolábil, encontrada no sobrenadante de culturas e é altamente tóxica para certos insetos através de administração oral ou intra-hemocélica, causando degeneração e lise de hemócitos (SILVA-WERNECK, 1997).  $\beta$ -exotoxina ou thuringiensina é uma toxina termoestável produzida por certas estirpes de Bt durante a fase vegetativa e secretada no meio de cultura. A gama de espécies de insetos suscetíveis a ela é bem maior que ao cristal ( $\delta$ -endotoxinas) produzido pela mesma bactéria e é capaz de causar a morte de espécies de Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Isoptera e Orthoptera (HABIB ; ANDRADE, 1998), mas por ser altamente tóxica para várias ordens de insetos e também vertebrados, os produtos comerciais de Bt à base de linhagens do sorotipo H1 foram substituídos por outros à base de linhagens não produtoras de  $\beta$ -exotoxina (SEBESTA et al., 1981; SILVA WERNECK, 1997; MONNERAT ; BRAVO, 2000).

Segundo MONNERAT ; BRAVO (2000) foi descrita por ESTRUCH et al. (1996) uma nova classe de proteínas inseticidas, Vip 3A, com atividade contra larvas de lepidópteros. Essas proteínas tem uma massa molecular de 88,5 kDa, são produzidas e secretadas por algumas estirpes durante as fases vegetativa e de esporulação, e apresentam atividade tóxica contra insetos pouco sensíveis à maioria das  $\delta$ - endotoxinas.

Descoberto por HANNAY (1953) o cristal protéico (corpo paraesporal) denominado de  $\delta$ -endotoxinas, é um agregado de moléculas, geralmente de forma bipiramidal (BOBROWSKI et al., 2002), com peso molecular de aproximadamente 230 kDa. Estes cristais protéicos podem variar em tamanho, forma é número entre os diferentes serótipos de Bt, sendo que, por exemplo, o serótipo H-14 pode ter de uma a quatro dessas inclusões protéicas, que podem ser ovóides, piramidais, bipiramidais, cubóides, ou ainda sem forma definida, sendo localizados na maioria dos casos fora dos exospório; com exceção para *Bt finitimus* (H-2), *B. popilliae* e as

subespécies *B. cereus fowler* e *B. cereus lewin* que os possuem dentro do exospório. O nome de  $\delta$ -endotoxina foi sugerido por HEIMPEL (1967), e esse cristal representa o componente principal dos produtos comerciais à base de Bt (HABIB ; ANDRADE, 1998).

Conforme HABIB ; ANDRADE (1998) as populações naturais desta bactéria são muito diversas quanto à sua patogenicidade. Uma vez que a grande maioria dos genes para toxinas é extracromossômica, novas combinações de toxinas podem sempre surgir naturalmente graças à transferência dessas partículas entre os diferentes isolados.

Sabe-se que o cristal protéico de Bt, em si, não tem ação tóxica, sendo considerado uma pró-toxina, necessitando a sua dissolução em meio alcalino, para que resulte em moléculas de tamanhos variáveis, das quais algumas são tóxicas para insetos. Desse modo às  $\delta$ -endotoxinas seriam algumas dessas moléculas que participam na formação do cristal. FAUST et al. (1982) afirmam que a dissolução deste cristal é sempre necessária para a liberação e atuação das  $\delta$ -endotoxinas. Isto explica porque apenas os insetos de pH intestinal alcalino são suscetíveis a esta bactéria e porque injeções intra-hemocélica do cristal intacto não tem efeito tóxico. Assim, sabe-se atualmente que a ação tóxica das  $\delta$  - endotoxinas depende da dissolução do cristal em meio enzimático alcalino.

### **2.3.2 Mecanismos de ação das proteínas Cry e caracterização de Bt**

A toxicidade desta bactéria a insetos é devida a presença de cristais tóxicos, que se constituem de proteínas com massa variável de 27 a 140 kDa, e apresentam formas variáveis. Alguns dos isolados de Bt contêm mais de um gene de  $\delta$ -endotoxina, sendo que a maioria dos genes que codificam essas toxinas localizam-se em grandes plasmídeos (SANCHIS et al., 1998). Segundo HOFTE e WHITELEY (1989) a durabilidade dos cristais é bastante variável, enquanto o esporo, que representa a forma de resistência da bactéria, pode sobreviver por vários anos, assim sendo este “fator persistência” depende das condições do ambiente.

Esta bactéria produz corpos de inclusões cristalinas (cristais) que contém proteínas sintetizadas durante a segunda fase do ciclo vegetativo, junto à formação do esporo (COPPING ; MENN, 2000). Segundo AGAISSE ; LERECLUS (1995) a inclusão cristalina pode ser responsável por mais de 25% do peso seco das células, sendo que a quantidade de toxina produzida em laboratório e o tamanho dos cristais indicam que cada célula tem que sintetizar de  $10^6$  a  $2 \times 10^6$  moléculas de  $\delta$ -endotoxinas para formar o cristal.

Estes cristais, constituídos de protoxinas, quando ingeridos pelo inseto são solubilizados pelo pH alcalino do sistema digestivo dos insetos; as protoxinas, em presença de enzimas digestivas, são convertidas em quatro ou mais polipeptídeos tóxicos ( $\delta$ -endotoxinas). Estes polipeptídeos associam-se a receptores específicos de ligação nas microvilosidades apicais das células do intestino médio dos insetos, formando poros e causando o desequilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular (FIUZA et al., 1996). O aumento na absorção de água causa divisão celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio, ocasionando a morte do inseto por inanição, uma vez que, pouco tempo após a infecção o mesmo pára de alimentar (KNOWLES, 1994; COPPING ; MENN, 2000; BOBROWSKI et al., 2003) ou por septicemia (contaminação geral do inseto).

Uma determinada cepa de Bt pode produzir um ou mais cristais e estes, por sua vez, podem conter uma ou mais toxinas com peso molecular variado. O *Bt kurstaki* HD-1 contém três Cry1 (130 kDa) e duas Cry2 (70 kDa), enquanto que *Bt tenebrionis* produz uma única toxina com peso molecular de 67 kDa. A forma do cristal é determinada pelo número de  $\delta$ -endotoxinas, sendo que uma correlação parcial entre a estrutura e composição da proteína é citada por LÓPEZ-MESA et al. (1996). A forma bipiramidal está relacionada com proteínas Cry1, formato de cubo com proteínas Cry2, forma composta ou amorfa com proteínas Cry4 e Cyt, cristais quadrados e achatados com proteínas Cry3.

O espectro de atividade inseticida destas proteínas inclui larvas de insetos das Ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera e Orthoptera bem como outros grupos tais como nematóides, protozoários e ácaros (WANG et al., 2003; CAPALBO et al., 2005) sendo estreito devido ao seu modo de ação. Os sítios de ligação além de estarem envolvidos na especificidade das toxinas cry, também

representam um mecanismo de resistência dos insetos às  $\delta$ -endotoxinas (FIUZA et al., 1996).

Atualmente, mais de 380 genes *cry* e mais de 20 *cyt* já foram clonados e seqüenciados. As proteínas estão classificadas em 53 classes Cry e 20 classes Cyt, de acordo com a similaridade da seqüência de aminoácidos ([http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt)). Os Cry1, Cry2 e grupos de Cry9 exibem atividade para Lepidoptera; o Cry3 e o Cry7 e grupos de Cry8 são muito tóxicos a Coleoptera e a proteína Cry1b com atividade contra Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (WANG et al., 2003). Programas de prospecção de genes e isolados de Bt em todo mundo têm levado a um espectro de atividade de toxinas mais amplo, como resultado do isolamento de novas estirpes, possuindo novos genes e toxinas ou diferentes combinações de proteínas (SILVA-WERNECK e ELLAR, 2007).

A descrição da serotipagem como método de classificação de Bt foi feita por BARJAC ; BONNEFOI (1962), e tem sido utilizada com sucesso para a descrição de serovar ou variedade, mas deve-se salientar que ela não reflete o patótipo da variedade, o qual é essencialmente definido pelas ( $\delta$ -endotoxinas) que constituem o cristal protéico. Os serótipos são normalmente depositados na coleção internacional do Centro de Referência de Bacillus Entomopatogênicos do Instituto Pasteur, Paris (SOSA-GÓMEZ et al., 1998). POLANCZYK (2004) ressalta que a caracterização bioquímica é difícil, principalmente porque Bt mostra variações nas respostas e por este tipo de caracterização não estar sempre associada a resultados de serotipagem.

Ao nível molecular, existem técnicas que podem ajudar na caracterização de Bt, técnicas que identificam os genes responsáveis pela toxicidade. A técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) permite identificar os genes das toxinas presentes em diferentes isolados de Bt, utilizando primers dos genes conhecidos das toxinas, para amplificá-los quando presentes no DNA em estudo, através de vários ciclos de duplicação do DNA e posterior visualização em gel de agarose, além de indicar o potencial inseticida de uma determinada toxina (SOSA-GÓMEZ et al., 1998; BRAVO et al., 1998; POLANCZYK, 2004). Os novos genes responsáveis por toxina *cry* desconhecidas são caracterizados por clonagem e sequenciamento direto do seu

DNA, depois que a análise do gel de proteína e o bioensaio indicarem tratar-se de uma toxina desconhecida (SANCHIS et al., 1989).

### 2.3.3 Utilização de Bt na agricultura

Dentre as bactérias utilizadas no controle biológico, Bt é responsável por 97% do mercado mundial de bioinseticidas, sendo que 200 produtos a base deste patógeno geram um faturamento anual de US\$ 10 a 140 milhões (BRAR et al., 2006; POLANCZYK, 2008). O continente americano é responsável por aproximadamente 50% desse consumo, principalmente os Estados Unidos e o Canadá, e de 8 a 10% se restringe a América Latina (GUERRA et al., 2001).

A produção desta bactéria começou na França em 1938, produto este denominado Sporeine e era efetivo contra diversas lagartas de hortaliças e pomares, mas as primeiras tentativas de utilização de Bt no controle de pragas foram feitas na Europa durante a década de 30. O interesse por este patógeno aumentou nos Estados Unidos após 1950, especialmente para o controle de lepidópteros (BEEGLE ; YAMAMOTO, 1992; POLANCZYK et al., 2003).

A busca pela preservação do meio ambiente e a produção de alimentos mais saudáveis incentivou a utilização de produtos biológicos, sendo que em 1970 foi lançado o bioinseticida com o nome de Dipel, produto este que tem como princípio a espécie *B. thuringiensis kurstaki* em sua formulação, provando ser mais potente que outros isolados desta bactéria (BEEGLE ; YAMAMOTO, 1992).

Conforme POLANCZYK (1999), antes de 1970 a maioria dos produtos com Bt era baseado na subespécie *B. thuringiensis thuringiensis* e apresentavam baixa eficácia não podendo competir com os agroquímicos tanto em eficiência, como em custo. Isto porque na maioria das vezes isolados desta espécie continham a  $\beta$ -exotoxina, tornando difícil estabelecer a especificidade do produto bem como a sua atuação sobre outros organismos. Em 1968, uma nova cepa provou ser mais eficiente que as anteriores. Em 1963, estimava-se que pelo menos 110 espécies de lepidópteros eram suscetíveis a produtos formulados com Bt (CROOKS, 1975).

Em 1976 foi caracterizado um isolado eficaz para o controle de insetos da Ordem Diptera, denominado *B. thuringiensis israelensis* e em 1983 outro letal para coleópteros denominado de *B. thuringiensis tenebrionis* (POLANCZYK et al., 2003; DIAS, 1992).

HABIB ; ANDRADE (1998) relatam que enquanto produtos à base da variedade *B. thuringiensis kurstaki* ocupavam um enorme espaço para combater pragas agrícolas de florestais, outros, à base da variedade *israelensis* estavam sendo utilizados para o controle de insetos da Ordem Diptera. Além da descoberta da variedade *B. thuringiensis tenebrionis*, foi caracterizado outro isolado o *B. thuringiensis aizawai*, usado no combate a lepidópteros. Os mesmos autores citam que apesar da alta patogenicidade de Bt, principalmente das variedades *thuringiensis* (serótipo H-1) e *kurstaki* (serótipo H-3a: 3b), a utilização eficiente de produtos comerciais à base deste bacilo depende de certos passos críticos, seja na fase de fermentação e formulação ou naquela de aplicação. As aplicações de campo devem ser antecipadas por ensaios de laboratório e de campo para verificar o nível de suscetibilidade de cada praga, e um critério rápido para fornecer tais informações seria a determinação do pH intestinal do inseto.

A produção e uso mundial do Bt estavam consolidados no início da década de 1980, estando o mercado dominado por produtos à base da cepa HD-1 de *B. thuringiensis kurstaki*, sendo estes produtos responsáveis, naquele momento, por 60% das vendas de produtos microbianos (VAN FRANKENHUYZEN, 1993). A partir da metade da década de 1980, foram obtidas as primeiras plantas transgênicas com a incorporação dos genes codificadores das proteínas tóxicas de Bt em plantas de fumo e tomate (DIAS, 1992). Segundo ELY (1993), mais de 50 espécies de plantas sofreram transformações deste tipo com resultados satisfatórios.

De acordo com NAVON (2000), na década de 1990, alguns fatos contribuíram para o incremento no uso de Bt, produtos com Bt recombinante ou não foram modificados visando um maior espectro de ação, surgimento de novas formulações utilizando a técnica de encapsulação das toxinas e/ou estimulantes de alimentação, avaliação das interações de Bt com insetos e aleloquímicos ou inimigos naturais e, manejo de resistência de insetos a Bt.

A utilização e pesquisa com Bt em alguns países da América Latina (Argentina, Colômbia, Cuba, Guatemala, México e Peru) encontram-se em estágio avançado, com vários projetos empenhados em incrementar o emprego de entomopatógenos no controle de pragas agrícolas. No Brasil os primeiros trabalhos foram realizados por FIGUEIREDO et al. (1960) e PIGATTI et al. (1960) que ressaltaram o elevado potencial desse entomopatógeno no controle de várias pragas. Mais foi em 1993 que foi iniciado o primeiro projeto utilizando Bt, para o controle de *Spodoptera frugiperda* pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Milho e Sorgo), em Sete Lagoas, MG. Além da Embrapa, várias outras instituições federais e estaduais de pesquisa vêm realizando estudos com Bt, no qual mais de 1.500 artigos e resumos foram publicados no Brasil sobre esse patógeno, mostrando o crescente interesse nesse microorganismo como tática do manejo integrado de pragas (POLANCZYK et al., 2008). Este mesmo autor relata que em países como Venezuela, Honduras, Bolívia, Chile e Costa Rica, as táticas de controle biológico envolvendo a utilização de produtos contendo Bt como ingredientes ativos são pouco utilizados ou a pesquisa se encontra em fase inicial, faltando informações básicas para sua adoção prática.

A utilização de produtos a base de Bt é altamente desejável em programas de controle de insetos devido a sua especificidade, já que preserva as populações de inimigos naturais e polinizadores, evitando desequilíbrios biológicos no agroecossistema, e rápida degradação do ambiente. Entre outras vantagens estão a possibilidade de serem produzidos em grande quantidades e o não favorecimento da ressurgência de pragas secundárias e terciárias (ALVES, 1998). A instabilidade do cristal protéico em campo, devido à ação ultravioleta, e o alto custo de produção, são fatores limitantes para o emprego destes inseticidas à base de Bt em escala comercial.

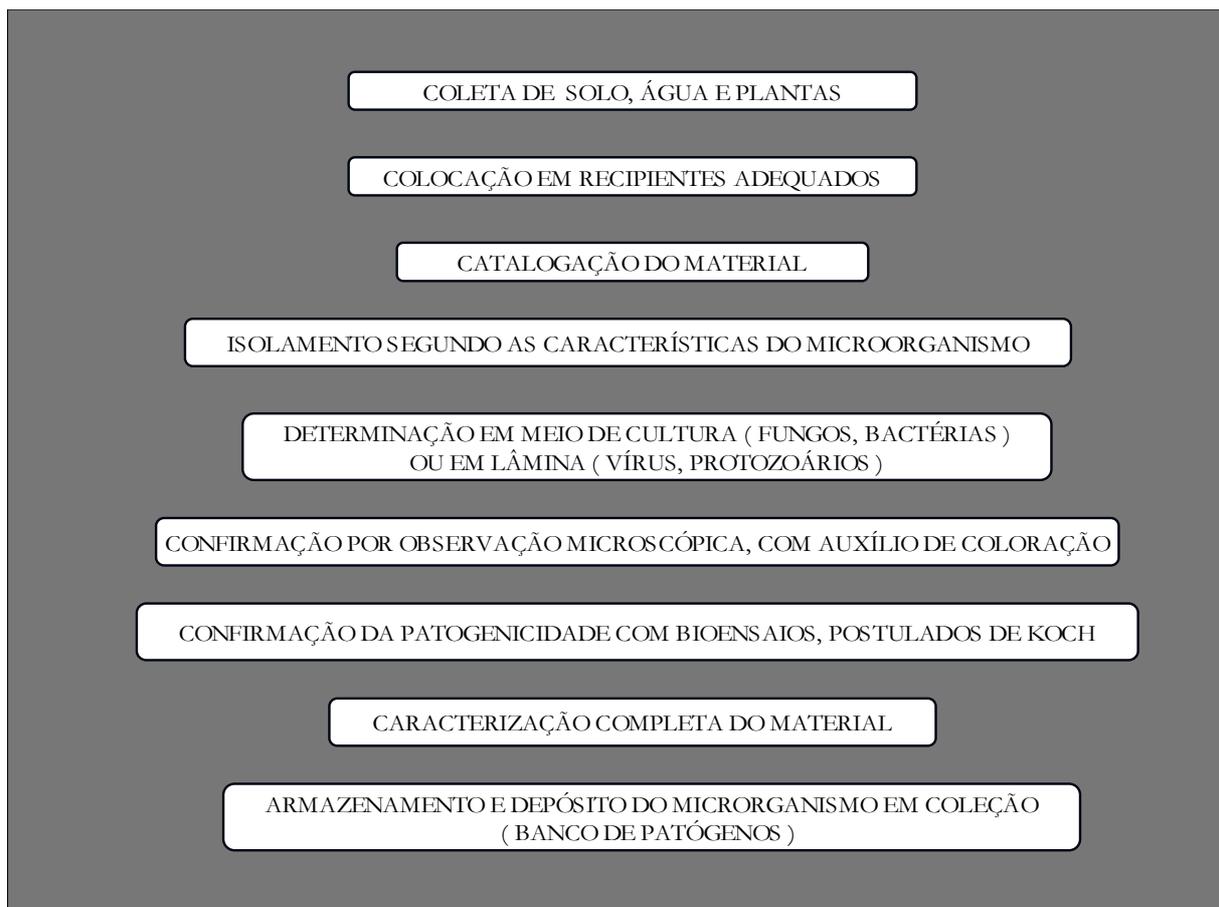
#### **2.4 Isolamento de entomopatógenos**

O isolamento de entomopatógenos é de grande importância, pois fornece subsídios para os estudos de dinâmica populacional e ecologia dos microorganismos no ambiente em que se encontram, permite o conhecimento da presença e diversidade

dos agentes de controle microbiano no ambiente e o impacto dos tratamentos culturais sobre tais populações, além de garantir a formação de bancos ou coleções de patógenos com finalidades didáticas e, principalmente, científicas, pois, dentre a vasta quantidade de patógenos existentes, muitos são promissores para serem empregados de forma aplicada em programas de controle biológico de pragas e vetores de doenças (ALVES et al., 1998). O procedimento básico a ser seguido, com o intuito de se elaborar uma coleção de entomopatógenos, pode ser visualizado na Figura 2.

Os locais onde se encontram variam de acordo com as características de cada microorganismo, porém no solo, na água e nas plantas a ocorrência de patógenos é mais comum, sendo também encontrados dispersos no ambiente ou associados aos insetos. A coleta pode ser realizada procurando-se insetos mortos, moribundos ou vivos, bem como buscando-se estruturas dos patógenos, como esporos, micélios, poliedros virais e formas infectivas de nematóides (ALVES et al., 1998). O Bt é encontrado em todos os ambientes terrestres e também em insetos mortos, plantas e detritos (HOSSAIN et al., 1997; DIAS et al., 1999; FORSYTH ; LOGAN, 2000; URIBE et al., 2003; WANG et al., 2003).

ALVES et al. (1998), relata ainda sobre o cuidado que se deve ter ao transportar o material coletado, acondicionando-o em recipientes adequados e em caixas de isopor ou sacolas térmicas, para se evitar danos aos patógenos presentes nas amostras. As amostras coletadas devem ser acompanhadas de uma ficha contendo o maior número possível de informações, como: número do material; nome científico e popular do microrganismo (ácaro ou inseto) hospedeiro; densidade populacional; procedência: fazenda, cultura, local da cultura, município, Estado; tipo de doença: epizootica ou enzoótica; sintomas da doença; tratamentos químicos/ biológicos efetuados na cultura; nome do coletor e data da coleta; outras observações.



**Figura 2** – Procedimento básico para elaboração de uma coleção de entomopatógenos descrito por ALVES et al. (1998).

#### 2.4.1 Métodos de coloração de bactérias entomopatogênicas.

Os diversos métodos de coloração são empregados para tornar mais evidentes certos detalhes dos patógenos, visando sua identificação e estudos básicos. Dentre os métodos de coloração de bactérias a mais importante é chamada de coloração de Gram. Essa técnica divide as bactérias em dois grandes grupos: gram-positivas (*B. thuringiensis*, *B. sphaericus*) e gram-negativas (*Pseudomonas* spp). Outra técnica bastante simples e rápida foi desenvolvida por SMIRNOFF (1962), através do qual as estruturas adquirem cores diferenciadas, facilitando sua visualização. Pode ser útil ao longo do processo de produção de Bt, para se determinar a proporção de esporos, cristais e células no meio de cultura. Porém a coloração diferencial de Bt (BENZ ; BORUSIEWICZ, 1963) apresenta maior vantagem em relação à anterior pelo fato de as estruturas adquirirem colorações muito diferentes,

o que permite sua visualização em objetivas comuns (sem o uso de óleo de imersão) (ALVES et al., 1998).

SILVA-WERNECK (2000) descobriu um novo isolado de Bt contra a lagarta-do-cartucho que causou 100% de mortalidade em lagartas de 3° ínstar, apresentando uma CL<sub>50</sub> de 37,0 ng/mL, demonstrando ser um isolado muito mais tóxico que o Dipel (CL<sub>50</sub> de 177 mg/ mL). Este isolado foi denominado de S93 sorologicamente identificado como *Bt kurstaki*, e produzia muitos cristais protéicos bipiramidais visíveis ao microscópio óptico sob contraste de fase corados por amido black.

#### **2.4.2 Isolamento de Bt a partir de amostras de solos**

O isolamento de Bt a partir de amostras de solo, visando descobrir novos isolados para o controle de insetos-praga e verificar a presença e diversidade desses agentes de controle no ambiente, vêm sendo realizados há muitos anos por pesquisadores do Brasil e de todo o mundo.

POLANCZYK (1999) testou 139 isolados em *S. frugiperda*, obtidos de 77 amostras de solo, oriundas de municípios do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, dos quais apenas 7 se mostraram ativos. SILVA-WERNECK (2000) testou 205 isolados de *Bacillus* contra lagarta-do-cartucho, provenientes de diferentes regiões brasileiras, no qual apenas um isolado, causou 100% de mortalidade. PINTO (2002) selecionou genes *cry* de 46 isolados de Bt, obtidos de amostras de solo oriundos de regiões produtoras de arroz irrigado do Rio Grande do Sul; genes estes que codificam proteínas ativas para coleópteros e lepidópteros prejudiciais à cultura do arroz. VALICENTE ; BARRETO, (2003) testaram isolados, a partir de 1448 amostras de solo provenientes de 10 estados do Brasil, contra lagartas de *S. frugiperda*, sendo que apenas 62% dos isolados mataram entre 81 e 100%. POLANCZYK, (2004) analisou 24 amostras de solos coletadas nos municípios localizados no estado de São Paulo para verificar a presença de Bt, confirmando tal patógeno em 41,2% das colônias. CAVALEIRO et al. (2005) a partir do processamento de 94 amostras de solos e 2 de insetos mortos, isolaram novas estirpes de bacilos obtendo 32 estirpes de Bt e 5 de *B. sphaericus*.

BRAVO et al. (1998) caracterizaram genes *cry* de linhagens de Bt a partir de amostras de solos do México, encontrando 456 isolados de Bt do total analisados. FORSYTH ; LOGAN, (2000) examinaram a presença de Bt em solos da Antártica, no qual três amostras foram positivas. Na Colômbia, ARANGO et al. (2002) identificaram e caracterizaram 1100 isolados de Bt altamente tóxicos para *S. frugiperda*. URIBE et al. (2002) verificaram a presença de linhagens nativas de Bt em amostras de solos obtidas de colheitas agrícolas e ecossistemas selvagens na Colômbia. Na Espanha, MARTINEZ ; CABALLERO, (2002) compararam duas coleções de Bt de habitat terrestres e aquáticos para estudar a possível inter-relação entre hábitat e características biológicas, verificando uma grande diversidade em ambas as coleções. HERNÁNDEZ et al. (2005) examinaram a ocorrência de Bt em 116 amostras de solos da Bolívia verificando a presença de Bt em 60% das amostras. CARMONA, (2002) realizou na Venezuela um trabalho de isolamento e caracterização de um isolado de Bt, e bioensaios qualitativos contra larvas de *S. frugiperda* revelando excelentes níveis de toxicidade.

Bt isolados de diferentes regiões da China a partir de diversos substratos foram analisados para estudar a distribuição, diversidade e detectar novos genes *cry*. Isolados que tinham genes tipo *cry1* foram os mais abundantes representando 76,5% dos isolados de Bt. (WANG et al., 2003). Neste mesmo país GAO et al. (2007) testaram a atividade inseticida de isolados de Bt obtidos de amostras de solos, contra os insetos *Plutella xylostella*, *Heliothis armigera*, *Phaedon brassicae* e *Locusta migratória manilensis* e o caracol *Oncomelania hupensis*. Alguns dos 570 isolados de Bt causaram alta mortalidade nas pragas analisadas. Nas províncias da região nordeste da CHINA (Yunnan e Hainan), 92 isolados de Bt foram obtidos de 683 amostras de solos. Várias formas de cristais foram observadas, incluindo bipiramidais, quadrados, ovóides, esféricos e amorfos (SU et al., 2007).

THAMMASITTIRONG ; ATTATHOM (2008), analisaram na Tailândia a distribuição e diversidade de gentes tipo *cry1*, *cry2* e *cry9* de 139 isolados de solos. Obtiveram 80,6% de genes *cry1*, 81,3 e 37,3% de genes *cry2* e *cry9* respectivamente. PINTO e FIUZA (2003) avaliaram a distribuição de seis famílias de genes *cry* de Bt, sendo que a presença de genes *cry9* foi detectada em 47,82% dos isolados, seguido de *cry3* (15,21%), *cry1* e *cry7* (ambos com 6,52%) e *cry2* (2,17%).

LIAO et al. (2002) testaram através de bioensaios toxinas inseticidas de Bt contra as principais pragas do algodão na Austrália, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa punctigera*. Os resultados mostraram que *H. armigera* era constantemente mais tolerante as proteínas de Bt que *H. punctigera*, embora ambos fossem suscetíveis a só uma gama limitada dessas proteínas. GOUGH et al. (2005) identificaram vários isolados de Bt a partir de várias amostras de solos australianos, contra a varejeira da ovelha (*Lucilia cuprina*), sendo altamente tóxicos a larva.

## **2.5 *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)**

### **2.5.1 Descrição e biologia**

*Anticarsia gemmatalis* é um dos desfolhadores mais freqüentemente associado com a cultura da soja no hemisfério ocidental e encontra-se distribuída em toda a região produtora dessa oleaginosa do continente americano. Porém, nos Estados Unidos não é tão importante como na América do Sul. No Brasil, é o principal alvo das aplicações de inseticidas, portanto é considerada uma praga-chave na cultura da soja (SOSA-GÓMEZ, 2000).

Os ovos medem aproximadamente 1 a 1,4 mm de diâmetro, são esféricos com base plana e de cor verde claro (COSTA, 1996). A fêmea oviposita durante a noite, com pico entre 21 e 23 horas, sendo os ovos depositados solitários sobre o caule, pecíolos ou na base abaxial dos folíolos (PRAÇA et al., 2006). A mariposa, durante sua vida de aproximadamente 20 dias, pode colocar em média 400 ovos e seu período reprodutivo dura entre 12 e 14 dias (SOSA-GÓMEZ, 2000).

A lagarta apresenta cor geral verde, com listras brancas longitudinais ao corpo. Quando em altas populações, as lagartas geralmente se tornam pretas, mantendo as listras brancas ao longo do corpo. Possuem quatro pares de pernas abdominais, além de uma anal. Nos primeiros estádios aparentam possuir apenas duas, podendo ser confundidas com lagartas falsas medideiras. Normalmente, a eclosão ocorre após 3 dias da oviposição, mas com baixas temperaturas pode ocorrer após 7 dias. O estágio larval tem duração de 14 a 18 dias dependendo da temperatura. No final

do último estágio larval, as lagartas medem em torno de 50 mm de comprimento adquirindo uma coloração castanha com tonalidade cor de rosa (SOSA-GÓMEZ, 2000). São muito ativas, dotadas de grande agilidade quando perturbadas nos instares iniciais como a lagarta mede palmo (GALLO et al., 2002).

A fase de pré-pupa dura em torno de dois dias. Nesta, fase a lagarta para de se alimentar, fica encolhida com aspecto umedecido e coloração rósea no dorso. São encontradas formando um casulo, unindo partículas de fezes por uma espécie de teia. As pré-pupas reagem ao contato com movimentos de contorção violentos, o que é uma forma de defesa. As pupas apresentam cor verde com um dia de formada e logo depois coloração marrom avermelhada, ficando quase preta próxima a emergência do adulto e sua fase transcorre no solo, durante 7 a 9 dias, a uma profundidade variável, porém não superior a 5 cm (PRAÇA et al., 2006).

A coloração dos adultos é variável, podendo ser encontrados espécimens cinzas, marrons, beges ou com tonalidades de azul claro. A envergadura das asas é de 30 a 38 mm. A identificação é possível pela presença de uma linha unindo as pontas dos pares de asas e a presença de pequenas circunferências esbranquiçadas próximas das margens externas da face ventral do segundo par de asas (GALLO et al., 2002).

A temperatura ótima de desenvolvimento é de aproximadamente 27°C. O tempo de desenvolvimento desde a fase de ovo até a fase adulta é de 31 a 46 dias, dependendo principalmente da temperatura (SOSA-GÓMEZ, 2000).

Existem, também, outras culturas em que a lagarta da soja causa prejuízos como cultura da alfafa, do amendoim, do arroz, da ervilha, do feijão, do feijão-vagem e do trigo, atacando durante a fase vegetativa e, em alguns casos, até no período da floração (PRATISSOLI, 2008).

A lagarta-da-soja costuma atacar as lavouras de regiões setentrionais a partir de janeiro no extremo Sul do País e chega a ocasionar 100% de destruição da área foliar (HOFFMANN et al., 1979; GAZZONI ; YORINIORI, 1995), sendo, portanto, de grande importância conhecer o comportamento desta praga e os métodos utilizados para o seu controle.

### 2.5.2 Prejuízos ocasionados por *A. gemmatalis*

A maior parte das vezes a lagarta-da-soja é encontrada na parte superior das plantas alimentando-se dos folíolos mais tenros da soja. Esta lagarta causa danos pela redução da área foliar. Nos estádios iniciais se alimenta das áreas internervais, formando orifícios de bordas irregulares de tamanho pequeno a médio e nos estádios mais tardios e em populações elevadas pode consumir as folhas inteiras. A capacidade de alimentação durante o período larval é aproximadamente 100 cm<sup>2</sup> da área foliar por lagarta, sendo que 98 % do consumo ocorrem nos três últimos estádios larvais. Normalmente, a lagarta consome os folíolos novos, mais tenros. Em condições favoráveis, este inseto pode causar desfolha total em áreas extensas. Ocasionalmente, a densidade pode atingir mais de 200 lagartas por pano de batida, mas densidades desta magnitude não são comuns. Na parte central da Argentina esta lagarta pode ser encontrada alimentando-se de vagens da soja (SOSA-GÓMEZ, 2000).

O monitoramento das populações dos insetos-praga é importante para o conhecimento do momento em que se deve iniciar a aplicação das táticas de controle. As populações de *A. gemmatalis* devem ser monitoradas através de amostragens feitas pelo método de pano de batida (PRAÇA et al., 2006).

As amostragens podem ser feitas dependendo do nível de infestação da espécie em intervalos semanais e caso ocorra aumento no número de insetos, a amostragem pode ser feita a cada três ou quatro dias (SUJII et al., 2001). O número de amostragens deve ser de acordo com o tamanho do campo de soja: campo de 1-9 ha (6 pontos de amostragem/ha), campo de 10-29 ha (8 pontos de amostragem/ ha), e campo de 30-99 ha (10 pontos de amostragem/ha) (GALLO et al., 2002).

Com relação à tomada de decisão de controle, recomenda-se o controle, quando forem encontradas em média 40 lagartas (maiores que 1,5 cm) por duas fileiras de plantas, ou menor número se a desfolha atingir 30% antes da floração, e 15% tão logo apareça as primeiras flores (GALLO et al., 2002). Para o controle com *Baculovírus anticarsia*, o controle de lagarta-da-soja é recomendando quando se detectarem no pano de batida um número médio de 40 lagartas pequenas (menores que 1,5 cm) ou 30 lagartas pequenas e 10 lagartas grandes por pano de batida. Em

condições de seca prolongada, e com plantas menores que 50 cm de altura, recomendam-se reduzir esses níveis para a metade (EMBRAPA, 2004).

### **2.5.3 Controle de *A. gemmatilis***

A lagarta-da-soja é o inseto mais comumente encontrado nas lavouras de soja, consumindo área foliar. Embora possam ser encontradas diversas espécies de lagartas, a maior densidade populacional corresponde quase sempre a esta praga considerada chave desta cultura (COSTA, 1996).

Para a recomendação da aplicação de inseticidas, deve ser considerado o estágio fenológico da soja, o nível populacional e a porcentagem de desfolha. Antes da floração a soja possui a capacidade de tolerar o desfolhamento. Desta maneira, durante o estágio vegetativo recomenda-se aplicar inseticida quando a população média atinge 40 lagartas grandes (maiores de 1,5 cm) por pano de batida e o nível de desfolha é de 30%. Após a floração não se deve permitir desfolha superior a 15%, considerando o mesmo nível populacional. Em anos úmidos os agricultores mais experientes podem evitar a aplicação de inseticidas quando verificam o aumento progressivo de *Nomurea riley*. O tamanho das lagartas é considerado importante, pois o consumo é muito maior após o terceiro ínstar, quando o tamanho é de 1,5cm (SOSA-GÓMEZ, 2000). Este mesmo autor relata que quando é utilizado o *B. anticarsia*, o momento de controle difere da aplicação de inseticidas convencionais ou a base de Bt. Assim a aplicação do vírus deverá ser realizada quando o número de lagartas por pano de batida for de 40 lagartas pequenas, menores de 1,5 cm.

Segundo MOSCARDI (1983) a dose de *B. anticarsia* é de 50 lagartas mortas pelo próprio vírus maceradas em um pouco de água e aplicadas em um hectare, ou 20 gramas do produto formulado por hectare.

#### 2.5.4 Controle químico

A lagarta-da-soja é suscetível a diversos grupos de inseticidas, ainda em baixas dosagens, por esse motivo inseticidas de baixa toxicidade podem ser utilizados obtendo-se níveis de controle satisfatório. Na escolha do produto considerar a sua toxicidade, os efeitos sobre os inimigos naturais e o custo por hectare (EMBRAPA, 2004), desde o início do ciclo da soja, a fim de possibilitar o estabelecimento de uma população de agentes de controle natural adequada (BOTELHO et al., 1999).

Geralmente são utilizados inseticidas fosforados, piretróides ou ainda carbamatos (PRATISSOLI, 2008). Entretanto, os produtos químicos devem ser utilizados quando forem atingidos os níveis de controle (GALLO et al., 2002). SOSA-GÓMEZ (2000) relatou que aplicações de inseticidas de amplo espectro como fosforados e piretróides na etapa inicial do ciclo da cultura podem favorecer o surto ou ressurgência de pragas posteriormente, sendo recomendável à aplicação de inseticidas seletivos.

Entre os químicos de maior seletividade podem-se mencionar os produtos fisiológicos que atuam interferindo no desenvolvimento normal da lagarta, à base de compostos como diflubenzuron (Dimilin), triflumuron (Alsystin 250 PM), lufenuron (Match CE), tebufenozide (Confirm 240 e Mimic 240 SC), metoxifenoazide (Intrepid 240 SC) (ANDREI, 2005). Esses produtos e os inseticidas biológicos apresentam uma seletividade tal, que sua ação complementa a ação dos inimigos de ocorrência natural na cultura da soja.

De acordo com GAZZONI (1994) resultados de pesquisas mostra que é viável a utilização de inseticidas biológicos a base de Bt, associados os inseticidas químicos, potencializando o controle e contribuindo para o manejo da resistência. Entre os inseticidas químicos o grupo dos piretróides sintéticos tem proporcionado controle efetivo das lagartas com excelente efeito de choque, com a vantagem de que, entre os grupos químicos convencionais, os piretróides são menos tóxicos quando comparados aos organofosforados ou carbamatos, podendo ser usados rotacionado com Bts, poupando a cultura de aplicações mais freqüentes com inseticidas químicos.

### 2.5.5 Controle biológico

O controle biológico de insetos praga é alvo de inúmeras pesquisas face aos riscos da utilização contínua de inseticidas convencionais que podem ocasionar a resistência das pragas ou a ocorrência de pragas secundárias. A lagarta-da-soja está sujeita ao ataque de um grande número de inimigos naturais que se encarregam de eliminar parte de sua população, exercendo, portanto, um controle natural sobre os mesmos. Geralmente são específicos e sua ocorrência na cultura pode depender da região, da época, do ano e das condições climáticas vigentes.

Entre os entomopatógenos importantes desta praga destaca-se o fungo causador da doença branca, *N. riley* (FARLOW) Samson. Este fungo produz epizootias em populações de *A. gemmatalis*, controlando naturalmente a praga em determinadas condições (SUJII et al., 2002). SOSA-GÓMEZ (2000) afirma que em anos úmidos, esse fungo tem um efeito espetacular, dizimando as populações rapidamente e evitando que o agricultor utilize inseticida, sendo que sua ocorrência elevada pode reduzir populações em mais de 90% dos indivíduos.

Os insetos benéficos que atacam a lagarta-da-soja podem ser divididos em parasitóides e predadores. Os parasitóides de ovos do gênero *Trichogramma* (Hym.: Trichogrammatidae) apresentam ampla distribuição geográfica, são altamente especializados e eficientes no controle de muitas espécies de lepidópteros (PRATISSOLI et al., 2005). De acordo com GAZZONI (1994), entre os predadores mais comuns de lagartas que ocasionam danos a soja, encontra-se insetos de diversas espécies de *Nabis* spp. (Hemiptera: Nabidae), *Geocoris* sp. (Hemiptera: Lygaeidae), *Orius* sp. (Hemiptera: Anthocoridae), *Podisus* spp. (Heteroptera: Pentatomidae) e diversas espécies de aranhas. Para BELORTE et al. (2004) as aranhas devido ao seu hábito polífago são predadores generalistas, controlam tanto desfolhadores (lagartas), como de sugadores (percevejos).

Um exemplo bem sucedido de controle biológico, como parte de um programa de MIP é o da lagarta-da-soja com a utilização de um vírus entomopatogênico, *B. anticarsia*. Segundo MOSCARDI (1998) vários fatores colaboraram para o êxito do programa de controle biológico desta lagarta com o baculovírus como: alta virulência do inimigo natural, fácil produção do bioinseticida, lagarta ser presa fácil

por atacar as folhas e o fator econômico. O mesmo autor ressalta que além das vantagens ecológicas, evidenciou-se uma vantagem econômica do Baculovírus em cerca de 70% quando comparado à aplicação de inseticidas químicos, em anos de alta ocorrência do inseto.

Outro microorganismo muito eficiente que pode ser utilizado contra *A. gemmatalis* é o *B. thuringiensis kurstaki*. Embora o Bt seja um microorganismo de ação rápida, sua persistência no campo é curta, portanto não sendo viável à reincidência natural do agente após a morte das lagartas. Existem vários produtos disponíveis no mercado com este princípio ativo, sendo que o mais conhecido é o Dipel. A dose recomendada para a lagarta-da-soja é de 0,5L/ha (PRAÇA et al., 2006).

#### **2.5.6 Atividade de Bt para o controle de *A. gemmatalis*.**

Em estudos realizados com Bt visando o controle da lagarta-da-soja, resultados positivos foram obtidos. E com os avanços proporcionados por novas técnicas laboratoriais e maior atenção dos pesquisadores em descobrirem isolados mais tóxicos para melhor controle da praga.

BOBROWSKI et al. (2001) testaram doze isolados de Bt contra *A. gemmatalis*, sendo que quatro novos isolados causaram 90% de mortalidade. BOBROWSKI et al. (2002) testaram dois isolados que foram altamente tóxicos a *A. gemmatalis*, executando uma caracterização preliminar usando serotipagem, microscopia eletrônica, reação de cadeia e polimerase (PCR), e sequenciamento de fragmentos de genes *cry1*. PRAÇA et al. (2004) selecionaram entre 300 isolados de Bt contra larvas de *A. gemmatalis*, *S. frugiperda*, *A. grandis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, sendo selecionados dois isolados que apresentaram atividades contras as três ordens de insetos. BATISTA et al. (2005) selecionaram e caracterizaram isolados de Bt tóxicos a lagarta-da-soja. Dentre 1375 isolados utilizados, somente 3 apresentaram 100% de mortalidade. CAVALEIRO et al. (2005) efetuaram um trabalho com o intuito de encontrar novos isolados de Bt e Bs para o controle de varias espécies de lagartas incluindo *A. gemmatalis*, no qual 13 isolados de Bt se mostraram ativos contra lepidópteros e um se mostrou ativo contra dípteros.

SILVA et al. (2002a) realizaram um trabalho de isolamento, identificação e caracterização de bacilos entomopatogênicos processando-se amostras de solos coletadas em todas as regiões do país. Os isolados foram patogênicos a *A. gemmatalis* (41,5%). GOBATTO (2007) obtiveram isolados de Bt a partir de amostras de solo da área urbana e rural e testaram sua toxicidade contra *C. quinquefasciatus* e *A. gemmatalis*. Isolados de solo indicaram um maior espectro entomopatogênico. MONNERAT et al. (2007) avaliaram a toxicidade de isolados de Bt contra os lepidópteros *A. gemmatalis*, *S. frugiperda* e *P. xylostella*, no qual 3 demonstraram significativamente uma maior eficiência que a linhagem padrão (*Bt kurstaki*). KNAAK ; FIUZA (2005) realizaram um trabalho que apontou uma análise histopatológica do sistema digestivo de larvas de *A. gemmatalis*, depois da interação in vivo do entomopatógeno *Bt kurstaki* e um vírus de poliedrose nuclear de *A. gemmatalis* (AgNPV), que representa as formulações Dipel (Abbott) e *B. anticarsia* (Embrapa-CNPSo), respectivamente. As avaliações de patogenicidade para a lagarta-da-soja, mostraram que no tratamento com AgNPV foi verificado uma mortalidade de 81,28%, na associação Btk/AgNPV, a mortalidade foi de 96,8% e só o tratamento com *Bt kurstaki* foi equivalente a 100%.

### 3. ISOLAMENTO DE *Bacillus thuringiensis* E PATOGENICIDADE PARA *Anticarsia gemmatalis*

#### RESUMO

Foram analisadas 19 amostras de solos para verificar a presença de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Baseando-se no método de isolamento proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS), foram obtidas 166 colônias bacterianas, sendo que destas 76 (61,7%) foram identificadas como *B. thuringiensis* pela presença dos cristais e 47 (38,3%) como *B. cereus* pela ausência destes. A relação entre o número de colônias bacterianas e as de Bt (iBt), variou de 0,13 a 0,76. Foi possível identificar, em microscopia de contraste de fase utilizando a técnica de coloração de gram, a forma do cristal em 55 (72,4%) dos isolados obtidos, sendo o formato bipiramidal predominante 36 (65,45%), seguida pela ovóide 16 (29,0%) e piramidal 3 (5,4%). Foram testados 14 isolados para lagartas de primeiro ínstar de *Anticarsia gemmatalis*, destacando-se os Nudemafi 02 e 07 que causaram mortalidade de 100% e foram semelhantes à estirpe padrão utilizadas, *B. thuringiensis kurstaki* (HD-1). Os isolados selecionados são os mais promissores para o manejo de *A. gemmatalis*.

**Palavras-chave:** Bactéria entomopatogênica. Isolados. Amostras de solo. Lagarta-da-soja

### **3. ISOLATION OF *Bacillus thuringiensis* AND PATHOGENECITY TO *Anticarsia gemmatalis***

#### **ABSTRACT**

To verify the presence of *Bacillus thuringiensis* (Bt), 19 soil samples have been assayed. Using the method proposed by World Health Organization (WHO) it has been obtained 166 bacterian colonies, and of these 76 (61,7%) were identified as *B. thuringiensis* for the presence of de crystals and 47 (38,3%) as *B. cereus* for the absence of these. The relationship between the total number of bacterian colonies and those that belonged to Bt group (iBt), varied from 0,13 to 0,76. It was possible to identify, microscope phase contrast using the technique of gram coloration, the shape of the crystal in 55 isolates (72,4%), and the shape common is bypiramidal 36 (65,45%), followed for the ovoid 16 (29,0%) and pyramidal 3 (5,4%). 14 isolates were tested against first instar larvae *Anticarsia gemmatalis*. The isolates Nudemafi 02 e 07 caused mortality of 100%, showed high toxicity compared to the standard used *Bacillus thuringiensis kurstaki* (HD-1). The selected isolates are the most promising for the control of *A. gemmatalis*.

**keywords:** Entomopatogenic bacterial. Isolates. Soil samples. *Anticarsia gemmatalis*

### 3.1 INTRODUÇÃO

O controle de insetos utilizando-se inseticidas convencionais de forma irracional tem levado a inúmeros problemas incluindo desenvolvimento de resistência dos insetos e ácaros, aumento de pragas secundárias normalmente controladas por inimigos naturais, riscos de contaminação de seres humanos, animais domésticos e águas subterrâneas, diminuição da biodiversidade, além de outros custos ambientais (CAPALBO et al., 2005). Estes são alguns dos problemas que tem estimulado o aumento de interesse em programas de controle integrado de insetos (VILAS BOAS et al., 2000) no qual o controle biológico é uma importante estratégia, pois utiliza meios naturais para diminuir a população de organismos considerados praga, em geral insetos, que causam danos econômicos às lavouras (ALVES et al., 2008).

Dentre os organismos empregados no controle biológico de insetos-praga, *Bacillus thuringiensis* BERLINER (Bt) se destaca por apresentar atividade tóxica contra mais de 1.000 espécies de insetos das Ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera e Orthoptera, estando inclusas importantes pragas agrícolas brasileiras (SCHNEPF et al., 1998; WANG et al., 2003; CAPALBO et al., 2005; VILAS-BOAS et al., 2000).

O Bt é uma bactéria gram-positiva, aeróbica podendo facultativamente crescer em anaerobiose, dentro da faixa de 10 a 45°C (ALVES et al., 1998). Suas células vegetativas possuem forma de bastonete e, quando em condições específicas, em geral desfavoráveis, desenvolvem um ciclo de esporulação típico de bacilos, com esporos de formato elipsoidal, localizando-se, ao serem formados, na região central ou paracentral da célula (VILAS-BOAS et al., 2002). Durante a fase de esporulação, Bt pode ser distinguido de outras *Bacillus* spp. pela sua habilidade para produzir inclusões protéicas cristalinas, que possuem atividade tóxica contra diferentes invertebrados, especialmente insetos (BOBROWSKI et al., 2002).

A prática de coleta e isolamento de entomopatógenos é muito importante, pois fornece subsídios para os estudos de dinâmica populacional e ecologia dos microrganismos no ambiente em que se encontram, permite a formação de bancos

ou coleções de patógenos com finalidades didáticas e, principalmente, científicas, pois dentre a vasta quantidade de patógenos existentes, muitos tem potencial para ser empregados de forma aplicada em programas de controle biológico de pragas e vetores de doenças (ALVES et al., 1998).

Linhagens de Bt têm sido isoladas principalmente a partir de amostras de solo (BRAVO et al., 1998; POLANCZYK 1999; FORSYTH ; LOGAN, 1999; SILVA, 2000; PINTO 2001; URIBE et al., 2002; ARANGO et al., 2002; MARTINEZ ; CABALLERO, 2002; LIAO et al., 2002; CARMONA, 2002; BOBROWSKI et al., 2002; WANG et al., 2003; VALICENTE ; BARRETO, 2003; PINTO ; FIUZA, 2003; POLANCZYK, 2004; GOUGH et al., 2005; HERNÁNDEZ et al., 2005; SU et al.; 2007; THAMMASITTIRONG ; ATTATHOM, 2008), de insetos vivos ou mortos (BERNHARD et al., 1997; PORCAR ; CABALLERO, 2002; CAVALEIRO et al., 2005) e silos de estocagem de grãos (BERNHARD et al., 1997; WANG et al., 2000), bem como outras fontes alternativas como o filoplano de espécies vegetais (KAUR ; SINGH, 2000) e a partir de amostras de água de rios e lagos (FURLANETO et al., 2000; RECHE ; FIUZA, 2005).

A cultura da soja abriga um número elevado de espécies de insetos, alguns causam sérios prejuízos à cultura sendo considerados como pragas principais. A lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) é um importante inseto-praga desta cultura, no qual suas larvas causam sérios danos, reduzindo a área foliar e, por conseguinte, a fotossíntese ameaçando a produtividade (MORALES et al., 1995). O controle tradicional desta praga emprega agrotóxicos, causando sérios efeitos como desenvolvimento de resistência a inseticidas, redução na população de inimigos naturais, e alto custo para os produtores (BISHOP et al., 1999).

O uso de Bt para o controle dessa importante praga-chave é considerado como uma alternativa eficiente, porém necessitando mais estudos com o intuito de selecionar novos isolados para um melhor controle populacional da lagarta. O objetivo deste trabalho foi isolar Bt de amostras de solos do Espírito Santo, analisando a diversidade deste patógeno nos solos da região sul do Estado e testar sua patogenicidade para *A. gemmatalis*.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

A pesquisa foi realizada no Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), Alegre.

### **3.2.1 Criação em laboratório de *A. gemmatalis***

As lagartas foram criadas em laboratório mantidas em dieta artificial (Greene et al., 1976) até a obtenção dos adultos, conforme as técnicas empregadas no laboratório do NUDEMAFI, em sala climatizada a temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 5\%$  e fotoperíodo de 12h.

### **3.2.2 Origem das amostras de solos**

Amostras de solos foram recebidas pelo Laboratório de Solos do CCA-UFES – Alegre e Núcleo de Difusão de Tecnologia em Floresta, Recursos Hídricos e Agricultura Sustentável (NEDTEC) - Jerônimo Monteiro - ES.

### **3.2.3 Isolamento de Bt de amostras de solo**

Para o isolamento, foram utilizadas 19 amostras de solos, provenientes de municípios localizados na região sul do Estado do Espírito Santo.

Neste procedimento, o método utilizado foi adaptado do protocolo da Organização Mundial de Saúde (OMS), de 1985, onde cada amostra de 1g de solo foi homogeneizada em 10 mL de água esterilizada. Uma alíquota de 1mL foi transferida para tubo de microcentrífuga tipo eppendorf e, após choque térmico ( $80^\circ\text{C}$  por 12 min) para eliminar as células vegetativas, foi diluído 10 e 100 vezes em água esterilizada. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  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 mantido em estufa, a 30°C durante 48 h.

As colônias obtidas foram avaliadas quanto à morfologia (forma, bordo, elevação, estrutura, tamanho e coloração), utilizando-se um Contador de Colônias modelo EC-550 A, selecionadas para as características correspondentes a bacilos e transferidas para meio contendo penicilina G a 100 mg/l, seletivo para Bt e *B. cereus* (Jung et al. 1998). Os isolados inoculados foram mantidos 24h a 30 ± 0,5 °C e 180 rpm em incubador rotativo.

Após este período cada amostra foi individualmente analisada quanto ao crescimento do microrganismo. Em seguida foram preparadas lâminas, utilizando a técnica de coloração de gram, e observadas em microscopia de contraste de fase (1.000x), para a verificação da presença de corpos de inclusões paraesporais (cristais) que permitem a diferenciação entre Bt (presença de cristais) e *B. cereus* (ausência de cristais).

Os isolados preliminarmente selecionados como Bt foram cultivados em Meio Usual Glicosado (MUG) (DE BARJAC ; LECADET, 1976) até a esporulação, sendo os esporos mantidos em tubos de microcentrífuga tipo eppendorf a -18°C. Outra forma de conservação foi a deposição dos esporos em substrato (papel filtro esterilizado), mantido em tubos de vidro lacrados.

De acordo com HOSSAIN et al. (1997) foi calculado o Índice Bt que corresponde ao número de isolados de Bt obtidos em relação ao número de colônias examinadas em cada amostra (nBt/nCB) (POLANCZYK, 1999).

### **3.2.4 Multiplicação dos isolados**

Os isolados de Bt foram cultivados em MUG a 28°C, a 180 rpm por 48h para um crescimento padrão dos mesmos. Após a lise bacteriana, a mistura contendo esporos, cristais e células vegetativas foram submetidas a três centrifugações consecutivas (5.000 rpm por 20 min), a fim de eliminar o meio de cultura e lavar o concentrado obtido.

### 3.2.5 Testes de patogenicidade

Após a multiplicação dos isolados, estes foram diluídos 10 e 100 vezes em água destilada esterilizada, onde o número de células bacterianas foi determinado conforme método descrito por ALVES e MORAES (1998).

Uma alíquota de 100 µL de suspensão de Bt na concentração de  $3 \times 10^8$  esporos/mL, foi aplicada na superfície do disco com dieta artificial, previamente distribuída em placas de acrílico (35 mm de diâmetro). Após a evaporação do excesso de umidade, 50 lagartas de primeiro instar, divididas em 5 repetições foram acondicionadas individualmente, completando o total de 15 tratamentos. No lote correspondente a testemunha (controle negativo) foi aplicada água destilada e esterilizada, em volume equivalente aos lotes tratados e em outro lote foi aplicado *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 (Dipel) como controle positivo. Para acondicionamento do material, utilizou-se câmara climatizada, regulada para  $25 \pm 0,5$  °C,  $65 \pm 10\%$  de UR e 12h de fotofase.

Os tratamentos foram avaliados diariamente até 7 dias após a aplicação. A mortalidade observada foi corrigida conforme Abbot (1925) e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias estimadas das mortalidades comparadas através do teste de agrupamento de médias Scott-knott ( $P=0.05$ ), utilizando o programa computacional SAEG (versão 4.0).

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Isolados de Bt obtidos de amostras de solo

Na obtenção de isolados de Bt foram processadas 19 amostras de solo, sendo que destas, quatro foram coletadas nos municípios de Atílio Vivacqua, duas em Presidente Kennedy, duas em Jerônimo Monteiro, duas em Guaçuí, duas em Alegre, seguido de uma em Muqui, São José do Calçado, Mimoso do Sul, Cachoeiro de Itapemirim, Ibitirama, Muniz Freire e Ibatiba, sendo estes municípios localizados na região sul do Estado do Espírito Santo (Figura 3). Em 14 das 19 amostras de solo (73,6%), isolados deste bacilo foram obtidos, mostrando a ampla distribuição deste patógeno nos solos da região sul do Estado.



**Figura 3** – Distribuição dos municípios do Espírito Santo onde foram coletadas amostras de solo. Alegre, ES. 2008.

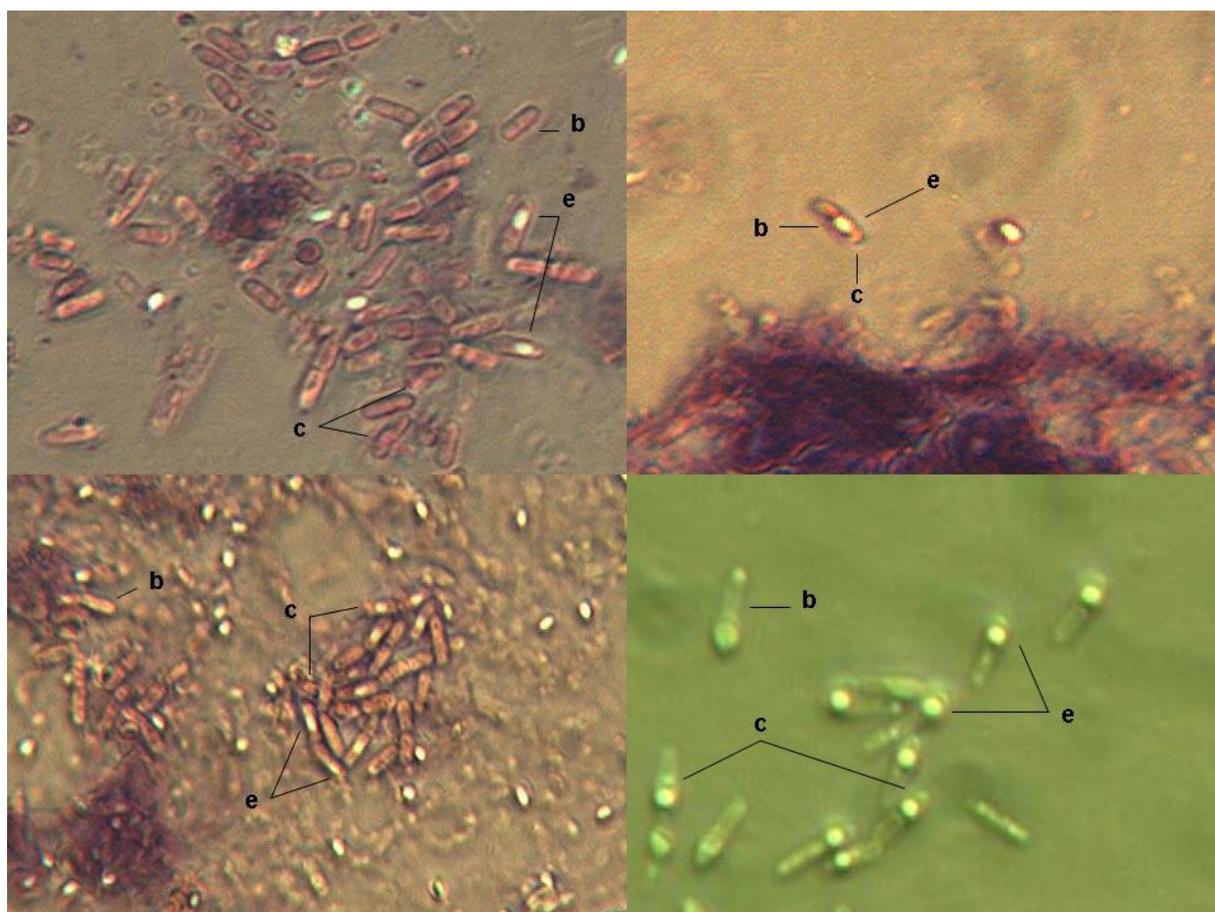
Em 16 das 19 amostras de solos foi constatada a presença de 165 colônias bacterianas (**CB**), estas foram analisadas morfológica e através do crescimento em meio seletivo, sendo 123 (74,5%) preliminarmente selecionadas como isolados de *Bacillus* sp. Dos isolados analisados (denominados de Nudemafi) em microscopia de contraste de fase, 76 (61,7%) foram identificados como Bt pela presença dos cristais e 47 (38,3%) como *B. cereus* pela ausência destes. O índice de colônias de Bt em relação ao número de colônias bacterianas (iBt) variou de 0,13 a 0,76 (Tabela 1). Na Tabela 1 é possível observar a procedência das amostras e o tipo de cultivo presente na área no período que antecedeu a coleta da referida amostra de solo.

**Tabela 1.** Isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidos de amostras de solos no Estado do Espírito Santo. CB: colônias bacterianas; Bt: isolados de Bt obtidos; iBt: índice Bt; Nudemafi: código do isolado selecionado para o teste de patogenicidade.

<b>AMOSTRA</b>	<b>Procedência</b>	<b>Cultivo</b>	<b>CB</b>	<b>Bt</b>	<b>iBt</b>	<b>Nudemafi</b>
01	Alegre	Café Arábica	07	02	0,40	01
02	Alegre	Sorgo	05	02	0,40	02
03	Jerônimo Monteiro	Eucalipto	25	19	0,76	03
04	Muqui	-----	16	02	0,13	04
05	Guaçu	Pastagem	19	05	0,26	05
06	Guaçu	Café Arábica	07	05	0,71	06
07	São José do Calçado	Café Conilon	03	02	0,66	07
08	Mimoso do Sul	Café Arábica	15	08	0,53	08
09	Presidente Kennedy	Cana de açúcar	----	----	----	09
10	Presidente Kennedy	Capineira	07	02	0,28	10
11	Atílio Vivacqua	Pastagem	----	----	----	11
12	Atílio Vivacqua	Café Conilon	12	07	0,58	12
13	Atílio Vivacqua	Sorgo/Milho	11	03	0,27	13
14	Atílio Vivacqua	Milho	10	05	0,50	14
15	Jerônimo Monteiro	Pastagem	18	10	0,55	15
16	Cachoeiro de Itapemirim	Pastagem	06	04	0,66	16
17	Ibitirama	Capim gordura	02	00	00	17
18	Muniz Freire	Eucalipto	----	----	----	18
19	Ibatiba	Café Conilon	02	00	00	19
<b>TOTAL</b>	-----	-----	165	76 (61,7%)	<b>0,35</b>	

Utilizando o mesmo método de isolamento, POLANCZYK (1999) obteve índices de 0,11 a 1,00 para isolados obtidos de 77 amostras de solos, a maioria oriunda de municípios do Rio Grande do Sul. O mesmo autor em 2004, a partir de 24 amostras de municípios localizados no Estado de São Paulo obteve índices que variaram de 0,24 a 0,69. A variação do número de colônias bacterianas obtidas entre as amostras pode ser explicada por diversos fatores incluindo os diferentes tipos de solos do Espírito Santo.

Foram observadas células em forma de bastonete, aglomerados, livres ou distribuídos em cadeia, com presença ou ausência de cristal (Figura 4). HABIB ; ANDRADE (1998) afirmam que as espécies do gênero *Bacillus* são representadas por células em forma de bastonetes, às vezes em cadeia, a maioria capaz de produzir endósporo.



**Figura 4** – Isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidos de amostras de solos, em microscopia de contraste de fase (1.000x), corados com a técnica de gram. bastonetes (b), cristais (c), esporos (e).

Verificaram-se poucas variações em relação à morfologia das colônias de Bt, onde a maioria apresentou forma circular e bordos irregulares e cor esbranquiçada. Estas características coincidem com as descritas por SOSA-GÓMEZ et al. (1998), que colônias com morfologia típica de *Bacillus*, possuem tamanho médio (aproximadamente 0,5cm), esbranquiçadas, opacas e com bordas irregulares.

Em 55 (72,4%) isolados de Bt foi possível determinar o tipo morfológico dos corpos de inclusões paraesporais (**CIP**) (bipiramidal, piramidal, ovóide, retangular ou

cubóide), sendo a forma bipiramidal a predominante 36 (65,45%), seguida pela ovóide 16 (29,0%) e piramidal 3 (5,4%) (Tabela 2). Nos isolados restantes, o aumento utilizado (1.000X) foi insuficiente para visualizar a forma dos cristais. Em 5 (9,0%) dos isolados foi observada a presença de mais de um cristal (oligocristalífero), predominando bacilos com somente um cristal (monocristalífero).

Do total de amostras de solos analisadas, as colônias provenientes da amostra do município de Jerônimo Monteiro (Nudemafi 3) apresentaram um maior número de colônias bacterianas (15,2%), isolados identificados como Bt (76%) e inclusões protéicas cristalinas caracterizadas 24 (43,6%), verificando 66% de cristais bipiramidais, 25 % redondos e 8,3% piramidais. Somente nesta amostra, foi observado a presença de *Bacillus sphaericus* (Bs) 2 (2,0%), sendo que esporos desta bactéria caracterizam-se por serem arredondados, localizados terminalmente em um esporângio em forma de raquete. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia dispõem de uma Coleção de Bacilos entomopatogênicos isolados a partir de amostras de solos, água e insetos oriundos de diferentes regiões do Brasil. Visando enriquecer o acervo do Banco foi realizado um trabalho de isolamento de novas estirpes de Bt e Bs a partir do processamento de 94 amostras de solos e duas de insetos mortos, sendo isoladas 32 estirpes de Bt e 5 de Bs (CAVALEIRO et al., 2005).

A visualização de cristais de formato bipiramidal foi predominante (65,45%), variando entre 50 e 100 % e cristais ovóides entre 33,3 e 50% dos isolados analisados. Isto indica que tais amostras podem possuir toxinas do tipo Cry1 e Cry2, que são tóxicas a insetos da ordem Lepidoptera e Diptera, necessitando de estudos posteriores (PCR) para confirmação da presença de genes que codificam estas proteínas. De acordo com GLARE E O' CALLAGHAM (2000) os cristais têm formatos diferentes e foi estudada a relação entre seu formato e a especificidade inseticida. Os cristais bipiramidais são tóxicos para lepidópteros, enquanto que os ovóides ou cubóides mostram atividade para lepidópteros e dípteros. POLANCZYK (2004) examinou a morfologia de cristais de 190 (41,21%) isolados identificados como Bt, e observou a predominância de cristais bipiramidais (47,9%), ovóides (23%), retangulares ou cubóides (21%) e irregulares (19%). Na coleção de isolados avaliados por VILAS BOAS (2002), os cristais bipiramidais foram encontrados em

154 isolados representando 68% da coleção. Cristais redondos, quadrados e irregulares também foram encontrados em 25, 11, e 37 isolados, ou seja, em 11, 5 e 16% da coleção respectivamente.

**Tabela 2.** Distribuição por municípios de *Bacillus thuringiensis* em amostras de solos.

Amostra Procedência	CB (%)	Bt (%)	CIP (%)	Bipiramidal (%)	Ovóide (%)	Piramidal (%)	Bs (%)
01 - Alegre	4,3	28,5	2 (3,63)	100,0	----	----	----
02 - Alegre	3,0	40,0	3 (5,45)	66,6	33,3	----	----
03 - Jerônimo Monteiro	15,2	76,0	24 (43,6)	66,6	25,0	8,3	2 (2,0)
04 - Muqui	9,6	12,5	2 (3,63)	100,0	----	----	----
05 - Guaçu	11,5	26,3	3 (5,45)	100	----	----	----
06 - Guaçu	4,3	71,4	6 (10,90)	50,0	50,0	----	----
07 - São José do Calçado	1,8	66,6	3 (5,45)	66,6	33,3	----	----
08 - Mimoso do Sul	9,1	53,3	2 (3,63)	50,0	50,0	----	----
09 - Presidente Kennedy	----	----	----	----	----	----	----
10 - Presidente Kennedy	4,3	28,6	----	----	----	----	----
11 - Atílio Vivacqua	----	----	----	----	----	----	----
12 - Atílio Vivacqua	7,3	58,3	6 (10,90)	33,3	50,0	16,6	----
13 - Atílio Vivacqua	6,6	27,2	1 (1,81)	100,0	----	----	----
14 - Atílio Vivacqua	6,0	50,0	----	----	----	----	----
15 - Jerônimo Monteiro	10,1	55,5	3 (5,45)	66,6	33,3	----	----
16 - Cachoeiro de Itapemirim	3,6	66,6	----	----	----	----	----
17 - Ibitirama	1,2	0,0	----	----	----	----	----
18 - Ibatiba	1,2	----	----	----	----	----	----
19 - Muniz Freire	----	----	----	----	----	----	----
Total	165	76	55 (72,4)	36 (65,45)	16 (29,0)	3 (5,4)	----

CB (%): Porcentagem de colônias bacterianas

Bt (%): Porcentagem de colônias identificadas como Bt

CIP (%): Porcentagem de inclusões protéicas cristalinas caracterizadas

Bipiramidal (%): Porcentagem de cristais bipiramidais caracterizados

Ovóide (%): Porcentagem de cristais ovóides caracterizados

Piramidal (%): Porcentagem de cristais piramidais caracterizados

Bs (%): Porcentagem de colônias identificadas como *B. sphaericus*

Neste trabalho a caracterização morfológica dos cristais obteve bons índices, que se justifica pelo uso do método de coloração de gram. Esta técnica divide as bactérias em dois grandes grupos: gram-positivas e gram-negativas, no qual Bt e Bs são evidenciados pela cor azul (Gram-positivos) e *Pseudomonas* spp. pela cor vermelha (Gram-negativos). Apesar do método de coloração de gram ter contribuído na avaliação morfológica dos isolados, tem como ponto negativo o tempo que se leva para preparação das lâminas, pois para o sucesso da técnica, o procedimento deve ser seguido criteriosamente. Para visualizar um maior número de isolados é importante otimizar o tempo. O ideal seria utilizar um corante mais prático e de ação rápida. Coomassie blue é um corante que possui tais características, pois deixam evidentes os cristais que adquirem uma coloração azul, facilitando a sua identificação e caracterização morfológica.

Um fator que pode explicar o sucesso do isolamento de Bt neste trabalho é o método utilizado, Organização Mundial de Saúde (OMS), pois é eficiente e de fácil execução. Diferentes metodologias estão descritas para o isolamento de isolados de *Bacillus* spp. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985) sendo realizada uma pesquisa por SILVA et al. (2002b) com o objetivo de selecionar, dentre as metodologias publicadas, uma que possibilitasse uma boa capacidade de recuperação de isolados de Bt e Bs. Para isso, 50 amostras de diferentes regiões do Brasil foram coletadas e três metodologias foram estudadas. De acordo com estes autores o método da OMS é mais adequado (Bt -10,3%; Bs -10,3%; outros bacilos - 79,4%) sendo superior aos métodos da filtração em algodão (8,8%; 8,8%; 80,4%) e do acetato (6,5%; 41,9%; 51,6%) para as condições edafoclimáticas brasileiras. A comparação entre os métodos permitiu concluir que se deve direcionar o método de isolamento em função da espécie que se deseja obter, ou seja, para o isolamento de Bt e outros bacilos deve-se empregar o método da OMS e para o isolamento de Bs o método do acetato.

Os variados índices (iBt) obtidos neste trabalho (Tabela 1) podem ser explicados porque este patógeno ocorre em diversos ambientes, e pode se multiplicar em microhabitats favoráveis como, por exemplo, os insetos-alvo, embora possam crescer e esporular em solos ricos em nutrientes.

De acordo com Organização Mundial de Saúde (1999), os insetos mortos contêm freqüentemente grandes quantidades de esporos e inclusões protéicas cristalinas que podem se disseminar no ambiente, mas são pouco prováveis que a principal fonte de toxinas e esporos seja os insetos colonizados, devido a sua baixa ocorrência epizootica. Este microorganismo dificilmente é encontrado ocasionando epizootias naturais em insetos, pois nem sempre esporula em insetos antes ou após sua morte. Mais alguns trabalhos (MEADOWS et al., 1992; PORCAR ; CABALLERO, 2002) relataram este fato, especialmente em insetos da Ordem Lepidoptera, e em local onde o Bt nunca foi aplicado. Segundo DAMGAARD (2000) estas epizootias ocorrem sob certas condições específicas em campo, criações de insetos em laboratório, e em locais de armazenamento de grãos. Um novo isolado de *Bt aizawai* estava isolado de uma lagarta morta do lepidóptero *Mythima loreyi*, coletada em uma colheita de milho na Espanha durante uma epizootia natural. Este

isolado denominado de Leapi01 foi caracterizado molecularmente e sua atividade inseticida testado contra lagartas de *H. armigera* e *S. littoralis*, indicando que este isolado tem potencial para ser usado como agente de controle biológico (PORCAR ; CABALLERO, 2002).

HOSSAIN et al. (1997) associaram o elevado número de isolados de Bt em amostras de solo à ocorrência de insetos nos locais onde foram coletadas as amostras, como ocorre na maioria dos países tropicais, facilitando a dispersão e multiplicação deste patógeno. Os resultados dos referidos autores não estão de acordo com os citados por MARTIN ; TRAVERS (1989) que analisaram 785 isolados de Bt originados de diversos habitats e não encontraram nenhuma correlação significativa entre ambientes de insetos e densidade de Bt. Os autores concluíram que a presença de insetos não implica na presença de Bt. Dados citados por CHAK et al. (1994), concluem que a maioria dos isolados obtidos tem como origens locais montanhosos, onde a densidade populacional de insetos é inferior quando compararmos com as áreas de menor altitude. Assim sendo, fatores abióticos como vento e chuva podem favorecer a dispersão do microrganismo no ambiente.

Pesquisas em diferentes regiões geográficas verificaram que Bt está presente em terras naturais, como também em locais de ocorrência de insetos. FORSYTH ; LOGAN (1999) na Antártica examinaram em 62 amostras de solo a presença de bactérias aeróbias formando endósporos. Neste trabalho os autores obtiveram em 36 amostras (58%) tais microrganismos, e três amostras isolados identificados como Bt.

No México BRAVO et al. (1998) caracterizaram genes *cry* de isolados de Bt a partir de uma coleção, obtidas de 503 amostras de solos coletadas de cinco macroregiões do país. Amostras vieram de campos cultivados (milho, sorgo, arroz, cana-de-açúcar, feijão, ervilha, café, cacau, noz, alfafa, pimenta, pêra espinhoso, planta agave, pêssigo, manga, mamão, melão, tomate, repolho, abóbora, cebola, brócolis, e cenoura) ou vegetação natural (bosque de pinos, floresta tropical decídua, floresta temperada, e gramados). Encontraram 456 (90,6%) isolados de Bt dos 503 isolados analisados.

Cento e oito amostras de solos, de áreas agricultáveis e ecossistemas selvagens situados na Colômbia foram avaliados em termos da presença de isolados nativos de Bt, verificando neste estudo que em 82% das amostras, contém pelo menos um isolado de Bt (URIBE et al., 2002). Neste mesmo país ARANGO et al. (2002) identificaram e caracterizaram 1100 isolados de Bt altamente tóxicos para *S. frugiperda*, obtidos de amostras de solos sendo que 32 isolados ativos foram encontrados. HERNÁNDEZ et al. (2005) examinou a ocorrência de Bt em 116 amostras de solos colecionadas de vales altos bolivianos e o Altiplano, entre 2000 e 4500 metros de altitude. Esta área é conhecida como “zona da batata” nos quais as principais pragas são *Phthorimaea operculella*, *Premnotrypes latihorax* e *Rhigopsidius tucumanus*. Bt foi encontrado em 60% das amostras de solos.

Na Venezuela foi realizado um trabalho de isolamento e caracterização de um isolado de Bt denominado de UCLA-10, proveniente de uma amostra de solo proveniente de um cultivo de repolho (*Brassica oleracea* L.). Análise (SDS-PAGE) verificou a presença de uma proteína de 130kDa, e bioensaios qualitativos contra lagartas de 1° instar de *S. frugiperda*, usando o complexo esporo-cristal, revelaram níveis de toxicidade equivalentes ao do controle positivo HD-1 (Carmona, 2002).

SILVA-WERNECK (2000) com o objetivo de encontrar princípios ativos que possam ser usados no controle da lagarta-do-cartucho testou 205 isolados de *Bacillus*, provenientes de diferentes regiões brasileiras, no qual um isolado de *Bt kurstaki*, causou 100% de mortalidade.

De acordo com Organização Mundial da Saúde (1999) a subespécie de Bt ativa para lepidópteros e coleópteros é principalmente associada com o solo e a superfície de folha, considerando que a subespécie ativa para díptera é encontrada comumente em ambientes aquáticos. Na Índia, isolados de Bt foram obtidos da superfície de plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum*), ervilha de pombo (*Cajanus cajan*), ervilha (*Pisum sativum*) e feijão de mong (*Vigna radiata*) e testada sua toxicidade para *Helicoverpa armigera*, sendo encontrados dois isolados com atividade inseticida comparável ao *Bt kurstaki* HD-1, podendo ser explorado para o desenvolvimento de bioinseticida (KAUR ; SINGH, 2000). MARTINEZ ; CABALLERO (2002) compararam duas coleções de Bt de habitat terrestres e aquáticos para estudar a possível inter-relação entre hábitat e características biológicas (isolado, conteúdo de gene *cry* e

toxicidade). Uma grande diversidade foi encontrada em termos de serovar e genes *cry* em ambas as coleções. O teste de toxicidade foi feito contra *Spodoptera armigera*, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Tipula oleracea* (Diptera: Tipulidae), sendo o número de linhagens mais tóxicas se encontrava em habitat terrestre (53%) do que em habitat aquático (41,6%). As linhagens analisadas neste trabalho estavam isoladas de ambientes da província espanhola de Navarre.

O solo constitui um reservatório natural de entomopatógenos, que se encontram principalmente nas formas de resistência ou adsorvidos à matéria orgânica ou a partículas minerais, abrigados da radiação ultravioleta e de temperaturas extremas. Alguns microbiologistas atribuíram a resistência dos esporos à sua parede ou capa impermeável, a qual, por sua vez, está associada ao complexo ácido dipicolínico-cálcio. Segundo PELCZAR et al. (1980) todos os esporos bacterianos contêm grandes quantidades de ácido dipicolínico, substância não identificada nas células vegetativas e a ocorrência deste ácido parece, pois, ser restrita aos esporos das bactérias. Observa-se, igualmente grande quantidade de cálcio e aceita-se que um complexo  $\text{Ca}^{2+}$  ácido dipicolínico-peptoglicano constitui a camada cortical. A síntese do ácido dipicolínico e a incorporação do cálcio ocorre durante as fases avançadas da formação do esporo.

POLANCZYK ; ALVES (2003) citam que são limitadas às informações sobre o destino dos cristais tóxicos de Bt no solo, e alguns trabalhos mostram que suas toxinas unem-se a ácidos húmicos, suplementos orgânicos ou com partículas de solo que as protegem da degradação por microorganismos sem perder sua atividade inseticida. A meia-vida de esporos de Bt nas folhas é muito menor que no solo (3 a 16 meses), no qual varia geralmente de um até três dias. O mesmo autor relata que os cristais são mais resistentes à radiação ultravioleta que os esporos, sendo que a atividade larvicida da bactéria reflete a atividade dos cristais, embora o número de esporos viáveis possa ser reduzido. POLANCZYK (2004) realizou experimento visando identificar alguns parâmetros do solo que influenciam a presença de Bt, verificando que Ca, Cu, Fe e Zn favorecem a presença desse patógeno, enquanto que Mn e Mg são elementos limitantes. De acordo com os resultados obtidos no trabalho desse autor, parece haver um limite quantitativo para cada elemento,

podendo os sais inorgânicos, dependendo de sua concentração, inibir ao invés de favorecer o crescimento de Bt. HOSSAIN et al. (1997) afirmam que o crescimento e germinação dos esporos podem ser prejudicados em solos arenosos, devido a pouca quantidade de nutrientes e água.

O solo constitui um ambiente complexo, influenciado por inúmeros fatores que governam a densidade das populações microbianas. No caso do entomopatógeno Bt, este ocorre em diversos habitats e facilmente isolado a partir de diferentes substratos por métodos práticos e eficientes. A sobrevivência dos seus esporos é essencial para sua permanência no solo, sendo sua distribuição dependente de fatores ecológicos que afetam 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.

### 3.3.2 Teste de patogenicidade

Nas avaliações, dos 76 isolados de Bt obtidos, 14 foram selecionados ao acaso para o teste de patogenicidade contra *A. gemmatalis*. Houve diferença estatística significativa entre os isolados pelo teste “F” (31, 570), no qual 13 foram patogênicos contra esta praga. Cada isolado selecionado corresponde ao município onde foi retirada a amostra (Tabela 1).

Os resultados da patogenicidade dos isolados de Bt contra *Anticarsia gemmatalis* obtidos, demonstram que 5 isolados causaram de 40% a 100% de mortalidade (Tabela 3). Os isolados Nudemafi 02 e 07 causaram a maior mortalidade (100%) seguido pelos isolados Nudemafi 03 (78,6%), 08 (50%) e 04 (41,30%). No caso dos

isolados Nudemafi 01, 05, 06, 10, 12, 13, 14, 15, 16, a mortalidade foi inferior a 22%, não diferindo estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% (Tabela 3).

Os isolados Nudemafi 02, 07 não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knot a 5%, mostrando níveis de toxicidade equivalentes ao controle HD-1 (Dipel) que também apresentou 100% de mortalidade, porém diferindo dos demais isolados. Bobrowski et al. (2001) relata que *B. thuringiensis kurstaki* HD-1, está sendo utilizado como linhagem padrão na maioria dos testes de patogenicidade desenvolvidos em cima de espécies de insetos da ordem Lepidoptera. Uma série de fatores poderia explicar a eficiência dos isolados, afetando diretamente a suscetibilidade dos insetos, podendo ocorrer por causa das interações sinérgicas entre as toxinas encontradas, ou mesmo, pela interação destas com esporos. Portanto se torna necessário realizar e analisar bioensaios com proteínas individuais e em conjunto para confirmar a toxina responsável pela mortalidade (LEE et al., 1996; SCHNEPF et al., 1998). Com relação à *A. gemmatalis*, WU et al. (1991) relatam que a atividade entomopatogênica pode ocorrer em razão da presença dos genes *cry1A*, como também pela presença de genes *cry2*, que são ativos contra insetos da ordem Lepidoptera.

**Tabela 3.** Mortalidade (%) ( $\pm$  Erro Padrão) de *Anticarsia gemmatalis* (Lep.: Noctuidae) inoculadas em dieta artificial contendo suspensão de isolados de *Bacillus thuringiensis*, obtidos a partir de amostras de solos, a  $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , U.R  $70 \pm 5\%$  e fotofase 12h. Alegre, ES. 2008.

Isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Mortalidade corrigida (%)
CONTROLE HD-1	100,00 $\pm$ 0,0 A
NUDEMAFI - 02	100,00 $\pm$ 0,0 A
NUDEMAFI - 07	100,00 $\pm$ 0,0 A
NUDEMAFI - 03	78,26 $\pm$ 14,17 B
NUDEMAFI - 08	50,00 $\pm$ 8,13 C
NUDEMAFI - 04	41,30 $\pm$ 18,38 C
NUDEMAFI - 06	21,73 $\pm$ 9,35 D
NUDEMAFI - 10	12,17 $\pm$ 7,22 D
NUDEMAFI - 14	10,43 $\pm$ 4,31 D
NUDEMAFI - 13	6,08 $\pm$ 4,47 D

NUDEMAFI - 12	5,21 ± 4,69	D
NUDEMAFI - 01	3,04 ± 2,53	D
NUDEMAFI - 05	0,86 ± 0,53	D
NUDEMAFI - 15	0,43 ± 0,43	D
NUDEMAFI - 16	0,00 ± 0,0	D

---

CV (%)

49,20

---

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott - Knot a 5%.

Os resultados satisfatórios com os isolados testados neste trabalho coincidem com os dados de muitos autores. MONNERAT et al. (2006) avaliaram a toxidade de uma coleção de 1400 isolados de Bt contra os lepidópteros *A. gemmatalis*, *S. frugiperda* e *P. xylostella*, sendo que 27 isolados mostraram ser tóxicos a larvas destes insetos e 3 demonstraram significamente maior eficiência que a linhagem padrão, *Bt kurstaki* HD-1. Os cristais são de formato bipiramidal, e a análise mostrou a presença de uma proteína de aproximadamente 130 e 65 kDa, sendo o alto nível de atividade inseticida deste isolado, os tornam candidatos excelentes para desenvolvimento de estudos de seu uso no campo. BOBROWSKI et al. (2001) testaram a patogenicidade de 12 isolados de Bt contra *A. gemmatalis*, obtidos a partir de amostras de solos de vários distritos do Rio Grande do Sul. Quando comparado a uma linhagem de Bt controle, conhecido pela sua alta toxidade para lagartas da soja, 4 novos isolados exibiram atividade tóxica superior, acima de 90% de mortalidade, mostrando maior toxidade que o *Bt kurstaki* HD-1, e toxidade semelhante ao *Bt thuringiensis* 4412 e *Bt kurstaki* HD-73. Os mesmos autores em outro trabalho, BOBROWSKI et al. (2002) testaram cristais purificados e solubilizados (protoxinas) de dois isolados que foram altamente tóxicos ao inseto designado na pesquisa anterior (UNI872 e UNI498) contra larvas de terceiro instar de *A. gemmatalis*. Os resultados apresentaram que os dois isolados são altamente tóxicos a esta praga, sendo que a CL<sub>50</sub> do *Bt kurstaki* UNI872 (0,49 ng/cm<sup>2</sup>) era três vezes menor do que o *Bt aizawai* UNI498 (1,68 ng/cm<sup>2</sup>).

CAVALEIRO et al. (2005) efetuaram um trabalho com o intuito de encontrar novos isolados de Bt e Bs visando o aumento do número de isolados disponíveis para o controle das lagartas *A. gemmatalis*, *S. frugiperda*, *P. xylostella* e dos mosquitos *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Os isolados S2049, S2052, S2056 e S2057 apresentaram dupla atividade, sendo os índices de mortalidade para *A. gemmatalis*

variando de 60 a 75%. SILVA et al. (2002a) com a finalidade de conhecerem um pouco melhor a distribuição espacial de Bs e Bt foi realizado um trabalho de isolamento, identificação e caracterização de bacilos entomopatogênicos processando-se amostras de solos coletadas em todas as regiões do país. Das 77 estirpes isoladas 39 (50,6%) apresentaram toxicidade a algum dos insetos testados, sendo que 32 (41,5%) foram patogênicas a *A. gemmatalis*; 4 ( 5,1%) a *S. frugiperda*; 7; (9,0%) a *A. aegypti*; 3 (3,8%) a *C. quinquefasciatus* e apenas 1 (1,2%) ao coleóptero *T. molitor*.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia têm realizado diversos testes com o intuito de encontrar e caracterizar isolados com maior toxicidade, que produzam toxinas diferentes das já existentes e que possam ser utilizadas na produção de bioinseticidas. Tendo em vista a importância desta praga para a agricultura brasileira, BATISTA et al. (2005) concluíram um trabalho de pesquisa que teve como objetivo a seleção e caracterização de isolados tóxicos a *A. gemmatalis*. Das 1375 isolados de Bt testados, 25 causaram 100% de mortalidade em bioensaios seletivos e foram selecionados para o bioensaio de dose. Os isolados S550, S845 e S1905 apresentaram alta toxicidade contra este inseto-praga, sendo o S845 o mais eficaz, podendo esses isolados ser utilizados como base para a produção de bioinseticidas para o controle de larvas de *A. gemmatalis*.

Visando o aumento no número de isolados disponíveis para o controle de insetos-praga, Praça et al. (2004) selecionaram entre 300 isolados de Bt efetivos simultaneamente contra larvas de *A. gemmatalis*, *S. frugiperda*, *A. grandis* e *C. quinquefasciatus*. Foram selecionados dois isolados de Bt, denominados de S234 e S997, que apresentaram atividades contras as três ordens de insetos. Os isolados selecionados para *A. gemmatalis* mostraram tão patogênicas quanto o padrão (Btk), com valores de  $CL_{50}$  estatisticamente semelhantes. GOBATTO (2007) visando reduzir o uso de substâncias químicas que normalmente são empregadas no controle de dípteros da família Simuliidae e lepidópteros da família Noctuidae, que prejudicam o desenvolvimento sócio-econômico da Serra Gaúcha, realizou um trabalho com o objetivo de obter isolado de Bt a partir de amostras de solo da área urbana e rural e de insetos coletados em municípios da região. Testes de patogenicidade contra *C. quinquefasciatus* e *A. gemmatalis*, com 84 isolados de solo

e 28 de insetos selecionados por apresentarem uma alta taxa de esporulação, indicaram que os isolados de insetos foram mais específicos, enquanto que o maior número dos provenientes de solo foi tóxico para ambas as espécies, indicando mais amplo espectro entomopatogênico.

Outro fator importante a ser discutido é com relação à presença de cristais bipiramidais (64,5%) nos isolados testados, o que poderia justificar a ação tóxica de Bt para larvas de *A. gemmatilis*. De acordo com HABIB ; ANDRADE (1998) essas formas vistas mediante a exames microscópicos podem fornecer indicações sobre a atividade inseticida dos cristais de um isolado. Cristais bipiramidais podem estar associados às proteínas do tipo Cry1, que apresentam atividade contra espécies das Ordens Lepidoptera e Coleoptera, e os cristais cubóides podem estar associados com as proteínas do tipo Cry2, que apresentam atividade contra espécies das Ordens Lepidoptera e Diptera (PRAÇA et al., 2004). BOBROWSKI et al. (2002) analisaram a morfologia de isolados (UNI872 e UNI498) que mostraram células bacterianas em forma de bastonete que contém esporo e um cristal. O isolado UNI872 apresentou formato cúbico ou quadrado e o isolado UNI498 foi observado um corpo de inclusão paraesporal com formato bipiramidal. Praça et al. (2004) mostraram que ambas as estirpes S234 e S997 possuem cristais bipiramidais, esféricos e cubóides, por meio de microscopia eletrônica de varredura.

Apesar do isolado Nudemafi 03 não ter demonstrado nível de toxicidade equivalente ao controle HD-1 (Dipel), apresentou mortalidade próxima a 80%, diferindo estatisticamente dos demais isolados (Nudemafi 08, 04, 01, 05, 06, 10, 12, 13, 14, 15, 16) sendo, portanto um isolado que apresenta boas características (Tabela 2). As populações naturais desta bactéria são muito diversas quanto à sua patogenicidade. Conforme HABIB ; ANDRADE (1998) a grande maioria dos genes para toxinas é extracromossômica e novas combinações de toxinas podem sempre surgir naturalmente graças à transferência dessas partículas entre os diferentes isolados. Segundo POLANCZYK (2004) a variação na eficiência dos isolados testados no seu trabalho, pode ser explicada por uma série de fatores, relacionados ou não, ligados ao modo de ação deste patógeno, como: dissolução do cristal, ativação da protoxina e ligação da toxina ativada a receptores no epitélio intestinal, o último mostra uma maior complexidade funcional e é, geralmente, determinante no

desenvolvimento da doença no inseto-alvo. Os receptores geralmente são específicos para determinadas toxinas Cry, sendo que para algumas espécies já foram identificados os que estão presentes nas microvilosidades apicais do intestino médio. VAN FRANKENHUYZEN (1993) salienta que além da afinidade pelos receptores presentes na membrana do intestino médio dos insetos suscetíveis responsáveis pelas diferenças no espectro de toxicidade dos isolados de Bt, outros fatores como: estabilidade da protoxina, solubilização diferencial dos cristais e o processo proteolítico subsequente são importantes no processo de intoxicação dos insetos alvo. O mesmo autor afirma que a toxicidade pode estar associada à capacidade da toxina formar poros na membrana após ligar ao receptor do epitélio intestinal.

Na etapa de seleção de isolados de Bt para *A. gemmatalis*, assim como para outros insetos, uma série de fatores afeta diretamente a suscetibilidade dos insetos, sendo necessários estudos posteriores para determinar as razões do sucesso ou não desta etapa. Por isso, é importante conhecer detalhadamente o inseto-alvo, seus hábitos, biologia, fisiologia e histologia e qual é a resposta do inseto para a presença do microorganismo. Para fins de seleção e realização de mais testes, somente os isolados Nudemafi 02, 07 atingiram máximos níveis de mortalidade (100%) sendo considerados promissores para o controle da lagarta-da-soja.

#### **4. CONCLUSÕES**

Nas condições em que este trabalho de pesquisa foi realizado pode-se concluir que:

- A bactéria entomopatogênica, *Bacillus thuringiensis* Berliner pode ser encontrada em solos de diferentes regiões do Espírito Santo, com ação patogênica para *Anticarsia gemmatalis*.

## 5. REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, 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. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: Alves, S. B. (Ed). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 1, p.21-38.

ALVES, S. B.; LEUCONA, R. E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 5, p.97-163.

ALVES, S. B.; ALMEIDA, J. E. M.; MOINO JR, A.; ALVES, L. F. A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 20, p.637-712.

ALVES, S. B.; MORAES, S. B. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 23, p.765-778.

ALVES, S. B.; MOINO Jr., A.; ALMEIDA, J.E.M. Desenvolvimento, potencial de uso e comercialização de produtos microbianos. In: Alves, S. B. (Ed.) **Controle Microbiano de insetos**. São Paulo: FEALQ, 1998. cap. 40, p.1143-1162.

ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; PEREIRA, R. M.; TAMAI, M. A. O controle microbiano na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. cap.1, p.21-110.

ANDREI, E. (Coord.). **Compêndio de Defensivos Agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola**. 7ª ed. rev. e atual. São Paulo: organização Andrei, 2005. 1141p.

ARANGO, J. A.; ROMERO, M.; ORDUZ, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colômbia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.92, n.8, p. 466-474, 2002.

BATISTA, A. C. et al. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas para o controle de *Anticarsia gemmatalis*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 19p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 82).

BEEGLE, C. B.; YAMAMOTO, T. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **The Canadian Entomologist**, v.124, n.3, p.587-616, 1992.

BELORTE, L. C. C.; RAMIRO, Z. A.; FARIA, A. M. Ocorrência de predadores em cinco cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill, 1917] no Município de Araçatuba, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, n.1, p.45-49, 2004.

BERNHARD, K.; JARRET, P.; MEADOWS, M. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insects pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.70, n.1, p.59-68, 1997.

BISHOP, A. H.; JOHNNSON, C.; PERANI, M. The safety of *Bacillus thuringiensis* to mammalian investigated by oral and subcutaneous dosage. **World Journal of Microbiology Biotechnol**, Oxford, v.15, p. 375-380, 1999.

BOBROWSKI, V. L.; PASQUALI, G., BONADESE-ZANETTINI, M. H., FIUZA, L. M.; 2001. Detection of *cry1* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from south of Brazil and atctivity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, p.105-109, 2001.

BOBROWSKI, V. L.; PASQUALI, G.; ZANETTINI, Maria Helena Bodanese; PINTO, Laura M. N.; FIUZA, L. M. Characterization of two *Bacillus thuringiensis* isolates from south Brazil and toxicity against *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). **Biological Control**, Orlando, v. 25, p. 129-135, 2002.

BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.843-850, 2003.

BOTELHO, P. S. M.; SILVEIRA NETO, S.; MAGRINI, E. A. Fator chave para *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em cultura de soja, para o estado de São Paulo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.56, n.4, 1999.

BRAR, S. K.; TYAGI, V. R. D.; VALÉRIO, J. R. Recent advances in downstream processes and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, 41: 323-42, 2006.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PENA, G.; NUNEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERON, M.; QUINTERO, R. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.12, p.4965-4972, 1998.

CAPALBO, D. M. F.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M. N.; SUZUKI, M. T. *Bacillus thuringiensis*. Formulações e Plantas transgênicas: **Biociência e Desenvolvimento**, Brasília, v.34, p. 78-85, 2005.

CARMONA, A. Isolation and partial characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bioagro**. v.14, n.1, p.3-10, 2002.

CAVALEIRO, H. et al. Novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* testadas contra larvas de insetos da ordem Lepidoptera e Diptera. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 22p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 87).

CHAK, K. F.; CHAO, D. C.; TSENG, M. Y.; KAO, S.; TUAN, S. J.; FENG, T. Y. Determination and distribution of cry-type genes de *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.7, p.2415-2420, 1994.

COPPING, L. G.; MENN, J.J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, Sussex, v.56, n.5, p.651-676, 2000.

COSTA, J. A. Cultura da soja. Porto Alegre: I. Manica, 1996. 233p.

CROOKS, M. Bacterial control of insects pests. **New Zealand journal of agriculture**, Wellington, v.130, n.1, p.24-27, 1975.

DAMGAARD, P. H. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.) **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, J. M. C. de S. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.27, p.59-76, 1992.

DIAS, S. C.; SAGARDOY, M. A.; SILVA, S. F.; DIAS, J. M. C. S. Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* isolates from argentinean soils. **BioControl**, Dordrecht, v.44, n.1, p.59-71, 1999.

EMBRAPA SOJA . Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 179p. (Embrapa Soja. Sistemas de produção, 9).

ELY, S. The engineering of plants to express *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J. et al. (Eds.) **Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Willey & Sons, 1993. p.105-124.

FALCON, L.A. 1971. Use of bacteria for microbial control, p. 67-95. In H. D. Burges & N. W. Hussey (ed.), **Microbial control of insects and mites**. New York, Academic Press, 861 p.

FAUST, R. M.; BULLA, A. L. JR. Bacterial and their toxins as insecticides. In: KURSTAKI, E., ed. Microbial and viral pesticides. New York: Marcel Dekker, 1982. p.75-206.

FIUZA, L.M., et al. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidea): evidence of shared binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.5, p.1544-1549, 1996.

FORSYTH, G.; LOGAN, N. A. Isolation of *Bacillus thuringiensis* Northern Victoria Land, Antarctica. **Letters in Applied Microbiology**, v.30, n.2, p.263-266, 2000.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; DE BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. 2002. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 920p.

GAO, M.; LI, R. DAI, S.; WU, Y. YI, D. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from soil in China and their pesticidal activities. **Biological Control**, Orlando, v. 44, n.3, p.380-388, 2008.

GAZZONI, D. L.; YORINIORI, J. T. Manual de identificação de pragas e doenças da soja. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1995. 128p. (Manual de identificação de pragas e doenças, 1).

GAZZONI, D. L. **Manejo de pragas da soja: uma abordagem histórica**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1994. 72p. (Documentos, 78).

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. **Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley, 2000. 350p.

GOBATTO, V.; BARROS, N. M. ; SPECHT, A. ; CAMASSOLA, M. ; DILLON, A. J. P. Isolamento, Avaliação e Caracterização de *Bacillus thuringiensis* para o controle de Diptera e Lepidoptera. **BioControl** (Dordrecht), 2007

GOUGH, J. M.; KEMP, D. H.; AKHURST, R. J.; PEARSON, R. D.; KONGSUWAN, K. Identification and characterization of proteins from *Bacillus thuringiensis* with high toxic activity against the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.90, p.39-46, 2005.

GREENE, G. L. LEPLA, N. C.; Dickerson, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium, **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.69, p.487-488, 1976.

GUERRA, P.T.; WONG, L.J.G.; ROLDÁN, H.M. et al. Bioinseticidas: su empleo, producción y comercialización em México. **Ciência UANL**, 4(2): 143-52, 2001.

HOFFMANN, C. B.; FOERSTER, L. A.; NEWMAN, G. G. Incidência estacional de *Nomurea rileyi* (Farlow) Samson em *Anticarsia gemmatalis* Hubner 1818 e *Plusia* spp. Relacionados com fatores climáticos. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 1., Londrina, 1978. **Anais...** Londrina: Embrapa CNPSo, 1979. v. 2. p. 11-15.

HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.383-446.

HERRERA-ESTRELLA, L. Transgenic plants for tropical regions: Some consideration about their development and their transfer to the small farmer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.96, p.5978-5981, 1999

HERNÁNDEZ, C. S.; ANDREW, R.; BEL, Y.; FERRÉ, J. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.88, n.1, p. 8-16, 2005.

HERRERO, S.; OPPERT, B.; FERRÉ, J. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the Indian meal moth. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.3, p.1085-1089, 2001.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v.53, p.242-255, 1989.

HOSSAIN, M. A.; AHMED, S.; HOQUE, S. Abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* in the agricultural soil of Bangladesh. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.70, n.3, p.221-225, 1997.

JUNG, Y. C.; KIM, S.U.; CÔTE, J.C.; LECADET, M. M.; CHUNG, Y. S.; BOK, S. H. Characterization of a new *Bacillus thuringiensis* subsp. *higo* strain isolated from rice bran in Korea. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.71, n.1, p.95-96, 1998.

KAUR, S.; SINGH, A. Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* in leguminous phylloplanes in the New Dhli region of India. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, n.3, p. 679-682, 2000.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Histopathology of *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) treated with nucleopolyedrovirus and *Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.36, p.196-200, 2005.

KNOWLES, B. H.. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxinas. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v.24, n.2, p.275-308, 1994.

LEE, M. K.; CURTISS, S. ALCANTARA, E.; DEAN, H. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAc on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.2, p.583-586, 1996.

LIAO, C.; HECKEL, D. G.; AKHURST, R. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 80, p.55-63, 2002.

LÓPEZ-MESA, J.E.; IBARRA, J.E. Characterization of a novel strain of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Massachusetts, v.62, n.4, p.1306-1310, 1996.

MARTÍNEZ, C.; CABALLERO, P. Contents of cry genes and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.92, n.3, p.745-752, 2002.

MARTIN, P. A. W.; TRAVERS, R. S. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, n.8, p. 2437-2442, 1989.

MEADOWS, M. P.; ELLIS, D. J.; BUTT, J.; JARRET, P.; BURGUES, H. D. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.4, p.1344-1350, 1992.

MONNERAT, R.S.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle Biológico**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.3, p.163-200, 2000.

MONNERAT, R. G. et al. Characterization of geographically distinct populations from *Plutella xylostella* to *B. thuringiensis* Berliner and RAPD-PCR. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, 2004.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; PATRÍCIA TELLES DE MEDEIROS, P. T. de.; MARTINS, E. S.; VIVIANE, M. M.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F., MORINAGA, C., DEMO, C.; GOMES, A. C. M.; FALCÃO, R.; SIQUEIRA, C. B.; JOSEILDE OLIVEIRA SILVA-WERNECK, J. O., BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological control**, Orlando, v.41, p-291-295, 2007.

MORALES, L.; MOSCARDI, F.; KASTELIC, J. G.; SOSA-GOMEZ, D. R.; PARO, F. R.; SOLDORIO, I. L. Suscetibilidade de *Anticarsia gemmatilis* Hübner e *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), a *Bacillus thuringiensis* (Berliner). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.24, p.593-58, 1995.

MOSCARDI, F. **Utilização de *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis***. Londrina, PR: Embrapa Soja, 1983. 21p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 23).

MOSCARDI, F. **Utilização de vírus entomopatogênicos em campo**. In: Alves, S. B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. 2ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 15, p. 509-540.

NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* application in agriculture. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application** Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.355-367.

PELCZAR, M. J.; REID. R.; CHAN, E. C. S. Morfologia e Ultra-estrutura das Bactérias. In: PELCZAR, M. J. ; REID. R.; CHAN, E. C. S. (Ed). **Microbiologia**. São Paulo: MacGraw-Hill do Brasil, 1980. v. 1, p.81-105.

PINTO, L. M. N. **Seleção de genes cry de *Bacillus thuringiensis* que codificam proteínas tóxicas a insetos-praga da cultura do arroz**. 75 f. Dissertação Mestre em Biologia. (Área de concentração: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre) Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2002.

PINTO, L. M. N.; FIUZA, M. F.; Distribuição de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* isolados de solos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n.4, p.699-702, 2003.

POLANCZYK, R. A. **Isolamento e Seleção de *Bacillus thuringiensis* Berliner para o controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith & Abbot, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 1999. 64 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

POLANCZYK, R. A.; MARTINELLI, S.; OMOTO, C.; ALVES, S. B. *Bacillus thuringiensis* no Manejo Integrado de Pragas. **Biotecnologia ciência & desenvolvimento**, Brasília, v.31, p.18-27, 2003.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. B. *Bacillus thuringiensis*: Uma Breve Revisão. **Agrociência**, v.7, n.1, p.1-9, 2003.

POLANCZYK, R. A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando o controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith)**. 2004. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências. Área de concentração: Entomologia). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

POLANCZYK, R. A.; VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. Utilização de *Bacillus thuringiensis* no controle de pragas agrícolas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. cap.4, p.111-136.

PORCAR, M.; CABALLERO, P. Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.89, n.4, p.309-316, 2002.

PRAÇA, B. L.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. de S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, ROSANA, F.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.39, n.1, p. 11-16, 2004.

PRAÇA, L. B.; SILVA NETO, S. P.; MONNERAT, R. G. *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818. Biologia, Amostragem e Métodos de Controle. Brasília: Embrapa, 2006. 18p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Documentos, 196).

PRATISSOLI, D.; VIANNA, U. R.; ZAGO, H. B.; PASTORI, P.L. Capacidade de dispersão de *Trichogramma* em tomateiro estaqueado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.40, n.6, p. 613-616, 2005.

PRATISSOLI, D. Disponível em:

<[http://200.252.165.4/agrofit/Probl\\_Fitossanitarios/PragaseDoencas/Index.htm](http://200.252.165.4/agrofit/Probl_Fitossanitarios/PragaseDoencas/Index.htm)>  
>Acesso em: 18 jun. 2008.

RECHE, M. H. L. R.; FIUZA, L. M. Distribuição e densidade de bactérias em áreas subtropicais de cultivo de arroz irrigado no Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 65, n. 3, p. 503-5011, 2005.

SANCHIS, V.; LERECLUS D.; MENO, G.; CHAUFAX, J.; LECADET, M. M. Multiplicity of  $\delta$  endotoxins genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis* aizawai 7.29. **Molecular Microbiology**, Salem, v.2, n.2, p.393-404, 1998.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.62, n.3, p.775-806, 1998.

SEBESTA, K.; FARKAS, J.; HORSKÁ, K.; VANKOVÁ, J. Thuringiensin, the Beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. In: BURGESS, H.D., ed. **Microbial control of pestes and plant diseases 1970-1980**. London: Academic Press, 1981. p.249-281.

SIEGEL, J.P. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* based insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.77, p.13-21, 2001.

SILVA, S. F.; DIAS, J. M. C. de S. Isolamento, Identificação e Caracterização Entomopatogênica de Bacilos de Diferentes Regiões do Brasil. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002a. 4p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Comunicado Técnico, 70).

SILVA, S. F. da.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G. Comparação entre três métodos de isolamento de bacilos entomopatogênicos. Brasília: Embrapa, 2002b. 3p. (EMBRAPA-Cenargen, Circular Técnica, 14).

SILVA-WERNECK, J.O. Caracterização da estirpe S93 de *Bacillus thuringiensis* subs. *kurstaki* efetiva contra a lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*). Brasília: Universidade de Brasília - Departamento de Biologia Celular, 1997. 143p. Dissertação de Mestrado.

SILVA-WERNECK, J. O.; ABREU NETO, F. R. M. V.; TOSTES, A. N.; FARIA, L. O.; DIAS, J. M. C. S. Novo isolado de *Bacillus thuringiensis* efetivo contra a lagarta-do-cartucho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 35, n.1, p.221-227, 2000.

SILVA-WERNECK, J. O.; ELLAR, D. J. Caracterização de uma nova toxina Cry 9Bb de *Bacillus thuringiensis*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 27p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 190).

SOSA-GÓMEZ, D. R.; TIGANO, M. S.; ARANTES O. M. N. Caracterização de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 22, p.731-814.

SOSA-GOMEZ, D. R. Essa lagarta gosta de soja. **Cultivar**, Pelotas, RS, v.12, p.40-42, 2000.

SUJII, E. R.; PIRES, C. S. S.; SCHMIDT, F. G. V.; ARMANDO, M. S.; PAIS, J. S. de O.; SANTOS, H. M. dos; BORGES, M. M.; CARNEIRO, R. G.; VALLE, J. V. V. Recomendações para o Controle Biológico de Insetos – Pragas na Soja Orgânica no Distrito Federal. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 8p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 53).

SUJII, E. R.; TIGANO, M. S.; SOSA-GOMES, D. Simulação do impacto do fungo *Nomurea rileyi* em populações da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.37, n.11, p. 1551-1558, 2002.

SU, X.; SHU, C.; ZHANG, J.; HUANG, D.; TAN, J.; SONG, F. Identification and Distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates from Primeval Forests in Yunnan and Hainan Provinces and Northeast Region of China. **Agricultural Sciences in China**, v.6, p.1343-1351, 2007.

THAMMASITTIRONG, A.; ATTATHOM, T. PCR-Based method for the detection of cry genes in local isolates of *Bacillus thuringiensis* from Thailand. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 98, p.121-126, 2008.

URIBE, D.; MARINEZ, W.; CERÓN, J. Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. **Jornal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.82, n.2, p.119-127, 2003.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. *Bacillus thuringiensis* Survey in Brazil: Geographical Distribution and Insecticidal Activity Against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.32, n.4, p. 639-644, 2003.

Van FRANKENHUYZEN, K. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. Chichester: John Willey.1993. cap.1, p.1-35.

VILAS-BÔAS, G. F. L. T. et al. Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil microcosm. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.31, p.255-259, 2000.

VILAS-BÔAS, G. F. L. T. **Diversidade e Estrutura Genética de Populações de *Bacillus thuringiensis* e de *Bacillus cereus***. 2002. 103 f. Tese (Doutorado em Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

WANG, J.; BOETS, A.; VAN RIE J.; REN G. Characterization of cry1, cry2, and cry9 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. **Jornal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.82, n.1, p.63-71, 2003.

WANG, J. H., WU, W. H., CHEN, Y. H.; REN, G. X. The ecology distribution of *Bacillus thuringiensis* and cry gene diversity in China. In: Abstracts of 5th International Conference on *Bacillus thuringiensis*. **Society for Invertebrate Pathology**, Guanajuato, Mexico, 2000, p.98.

WHITELEY, H.R.; SCHNEPF, H.E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual review of microbiology**, Palo Alto, v.40, p.549-576, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide**. Geneva: /UNDP: World Bank/WHO 1985. 24p. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Microbial Pest Control Agent: *Bacillus thuringiensis***. Environmental Health Criteria 217. Geneva/UNDP: World Bank/WHO. 125p. 1999.

WU, D.; CAO, X. L.; BAI, Y. Y.; ARONSON, A. I. Sequence of na operon containing a novel delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.65, p.31-35, 1991.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)