

**Determinação da susceptibilidade de *Spodoptera frugiperda* a
diferentes subespécies de *Bacillus thuringiensis***

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá
Diretores Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 88

Determinação da susceptibilidade de *Spodoptera frugiperda* a diferentes subespécies de *Bacillus thuringiensis*

V. Melatti

A. Batista

C. Demo

L. Praça

C. Brod

R.G. Monnerat

Brasília, DF
2005

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3348-4739 Fax: (61)

3340-3666 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005):

D 479 Determinação da susceptibilidade de *Spodoptera frugiperda* a diferentes subespécies de *Bacillus thuringiensis* / Viviane Melatti ... [et. al.]. – Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 14.p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 88)

1. Lagarta. 2. Bacteria. 3. Bioinseticidas. 4. Sorotipos. I. Batista, Andrea. II. Demo, C. III. Praça, Lílian Botelho. IV. Brod, Claudia. V. Monnerat, Rose Gomes. VI. Série.

595.78 – CDD 21

Sumário

Resumo	6
Abstract	7
Introdução	8
Metodologia	8
1. Origem das estirpes	8
2. Caracterização entomopatogênica	9
Resultados e Discussão	10
Conclusões	12
Referências Bibliográficas.....	12

Determinação da susceptibilidade de *Spodoptera frugiperda* a diferentes subespécies de *Bacillus thuringiensis*

V. Melatti¹
A. Batista²
C. Demo³
L. Praça⁴
C. Brod⁵
R.G. Monnerat⁶

Resumo

Spodoptera frugiperda, conhecida como a lagarta-do-cartucho-do-milho, é um inseto polífago que ataca diversas culturas, principalmente o milho e o algodão. Dados de literatura relatam este inseto como pouco susceptível aos produtos comerciais à base de *Bacillus thuringiensis*. Este trabalho teve como objetivo a seleção de subespécies de *B. thuringiensis* tóxicas a *S. frugiperda*. Foram testadas 27 subespécies diferentes de *B. thuringiensis* pertencentes ao Banco de Germoplasma de *Bacillus* Entopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As estirpes S608, S615, S1450 e S1576, pertencentes aos sorotipos *fukuokaensis*, *sotto*, *kurstaki* e *aizawai*, respectivamente, foram as mais tóxicas entre todas as analisadas.

¹ Bióloga – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Bióloga – Mestranda em Ciências Agrárias – Universidade de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Bióloga – Mestranda em Ciências Agrárias – Universidade de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴ Engenheira Agrônoma – Mestre em Ciências Agrárias – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁵ Engenheira Agrônoma – Técnica de Nível Superior – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁶ Bióloga – PhD - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, *Spodoptera frugiperda*, bioinseticidas e sorotipos.

Determination of the susceptibility of *Spodoptera frugiperda* to different subspecies of *Bacillus thuringiensis*

Abstract

Spodoptera frugiperda, known as velvet caterpillar, is a polyphagous insect that attacks many cultures, particularly corn and cotton. The literature relates that this insect is few susceptible to commercial products containing *Bacillus thuringiensis*. The aim of this project was to select subspecies of *B. thuringiensis* belonging to the collection of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. Strains S608, S615, S1450 and S1576, belonging to the serotypes *fukoukaensis*, *sotto*, *kurstaki* and *aizawai*, respectively, were the most toxic strains.

Key-words: *Bacillus thuringiensis*, *Spodoptera frugiperda*, bioinsecticides and serotypes.

Introdução

Spodoptera frugiperda ou lagarta-do-cartucho-do-milho é uma das mais importantes pragas agrícolas do Brasil e das Américas. Por ser polífaga ataca diversas culturas como o milho, algodão e arroz (CRUZ et al., 1999). A severidade do ataque dessa praga vem aumentando em algumas áreas, podendo causar até 60% de redução no rendimento de grãos (CRUZ et al., 1999; MEREGE, 2001).

O controle deste inseto tem sido realizado através do emprego de produtos químicos que, além de poluírem o ambiente, podem causar a seleção de populações resistentes. A utilização de agentes de controle biológico é uma alternativa viável e bioinseticidas formulados à base de *Bacillus thuringiensis* vem apresentando um resultado satisfatório no controle de insetos-praga (MONNERAT e BRAVO, 2001).

A toxicidade desta bactéria é devida à produção de inclusões protéicas, conhecidas como proteínas Cry, durante o período de esporulação da bactéria. Essas proteínas estão subdivididas em 49 classes, sendo codificadas por mais de 300 genes diferentes (CRICKMORE, 2001).

Taxonomicamente as estirpes de *B. thuringiensis* são agrupadas por sorotipos ou subespécies. Esta classificação baseia-se num método proposto por de Barjac e Bonnefoi (1962), que divide a espécie *B. thuringiensis* em 82 subespécies de acordo com uma reação de aglutinação flagelar. No mercado são encontradas formulações à base de *B. thuringiensis* subespécies *kurstaki* e *aizawai*.

Existem poucos relatos da susceptibilidade de *S. frugiperda* ao *B. thuringiensis*, assim são necessários estudos visando identificar novas estirpes para o controle deste inseto. Este trabalho teve como objetivo verificar a susceptibilidade de *S. frugiperda* a diferentes subespécies de *B. thuringiensis*.

Metodologia

1. Origem das estirpes

Foram utilizadas 27 estirpes de diferentes sorotipos de *B. thuringiensis* pertencentes ao Banco de Germoplasma de *Bacillus* Entomopatogênicos da

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Essas estirpes foram isoladas a partir de amostras de solo e água (MONNERAT et al., 2001).

As estirpes utilizadas são pertencentes aos seguintes sorotipos: *indiana* (S18), *tolworttsi* (S68), *israelensis* (S89), *kenyae* (S109), *morrisoni* (S130), *tohokuensis* (S141), *tochigiensis* (S202), *entomocidus* (S456), *galleriae* (S597), *fukuokaensis* (S608), *darmastadiensis* (S612), *sotto* (S615), *sooncheoon* (S619), *alesti* (S655), *ostrinae* (S700), *japonensis* (S711), *tenebrionis* (S1022), *muju* (1066), *argentiniensis* (S1068), *xiangiongies* (S1078), *selouensis* (S1207), *finitimus* (S1267), *canadensis* (S1271), *pakistani* (S1365), *kurstaki* (S1450), *kumamotoensis* (S1457) e *aizawai* (S1576).

2. Caracterização entomopatogênica

As estirpes foram testadas contra larvas de *S. frugiperda* obtidas da criação massal estabelecida desde 1989 na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (SCHMIDT et al., 2001).

Foram realizados dois tipos de bioensaios, o seletivo, que visou a seleção das estirpes que causaram mortalidade acima de 70% e os de dose, onde foi calculada a concentração letal necessária para matar 50% da população testada (CL50) das estirpes selecionadas.

Para a realização dos bioensaios seletivos, 35µl da cultura de cada uma das estirpes cultivadas em meio líquido NYSM (YOUSTEN, 1984) a 200rpm, 28°C, durante 72h, foi adicionada na dieta dos insetos previamente distribuída em placas de cultivo de células com 24 poços. Após a absorção da cultura crescida pela dieta nas placas de cultivo de célula, uma larva de segundo instar foi colocada em cada poço. Uma placa foi deixada sem a adição da bactéria, sendo utilizada como testemunha.

A primeira avaliação do teste foi feita 48h após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas foram passadas para copinhos de plástico de 50mL, contendo dieta livre do bacilo. No sétimo dia do ensaio foi feita a segunda e última leitura (MONNERAT et al., 2001).

O bioensaio de dose foi realizado com as estirpes liofilizadas. Para isso, cada uma foi cultivada por 72 horas, centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos, a 4°C,

congelada “overnight” e liofilizada por 18h. Após liofilização, foram preparadas diluições de acordo com a tabela 1. 35µl de cada suspensão foi colocada sobre a dieta distribuída em placas de acrílico contendo 24 poços. O processo de avaliação foi o mesmo realizado nos bioensaios seletivos.

Tabela 1. Tabela de diluições e concentração final de bactéria em cada dose, para a realização de bioensaios contra lepidópteros.

Suspensão I (µl)	Bactéria (mg)	Água (µl)	Concentração (µg/ml)
1		1000	1000
Suspensão II (µl)	Suspensão I (µl)	Água (µl)	Concentração (µg/ml)
571,4		428,6	571,4
Dose	Suspensão II (µl)	Água (µl)	ng/cm ²
1	200	800	2000
2	120	880	1200
3	72	928	720
4	43,2	956,8	432
5	25,9	974,1	259
6	15,5	984,5	155
7	9,3	990,7	93
8	5,6	994,4	56
9	3,4	996,6	34
10	2,0	998,0	20

Os dados de mortalidade obtidos foram analisados através de análise de Probits (FINNEY, 1971) e a concentração letal foi determinada.

Resultados e Discussão

Das 27 estirpes testadas, apenas as estirpes S608, S615, S1450 e S1576, pertencentes aos sorotipos *fukuokaensis*, *sotto*, *kurstaki* e *aizawai*, respectivamente,

causaram mortalidade acima de 70% em bioensaios seletivos (Tabela 2). A estirpe S1450 foi a mais eficaz no bioensaio seletivo, apresentando a maior toxicidade entre todas as estirpes analisadas.

Tabela 2. Resultados dos bioensaios seletivos contra *S. frugiperda*.

Estirpes	Mortalidade (%)
<i>indiana</i> (S18)	41,6
<i>tolworthi</i> (S62)	25,0
<i>israelensis</i> (S89)	50,0
<i>kenyae</i> (S109)	25,0
<i>morrisoni</i> (S130)	16,0
<i>tohokuensis</i> (S141)	16,0
<i>tochigiensis</i> (S202)	25,0
<i>entomocidus</i> (S456)	33,3
<i>galleriae</i> (S597)	41,6
<i>fukuokaensis</i> (S608)	91,6
<i>darmstadiensis</i> (S612)	8,3
<i>sotto</i> (S615)	83,3
<i>sooncheoon</i> (S619)	16,0
<i>alesti</i> (S655)	16,0
<i>ostrinae</i> (S700)	58,3
<i>japonensis</i> (S711)	41,6
<i>tenebrionis</i> (S1022)	0,0
<i>muju</i> (1066)	8,3
<i>argentiniensis</i> (S1068)	41,6
<i>xiangiongies</i> (S1078)	8,3
<i>selouensis</i> (S1207)	8,3
<i>finitimus</i> (S1267)	8,3
<i>canadensis</i> (S1271)	41,6
<i>pakistani</i> (S1365)	16,0
<i>kurstaki</i> (S1450)	100,0
<i>kumamotoensis</i> (S1457)	0,0
<i>aizawai</i> (S1576)	83,3

Nos bioensaios de dose, a estirpe S608 (sorotipo *fukuokaensis*) apresentou CL_{50} inferior as demais testadas (Tabela 3), entretanto, analisando-se os intervalos de confiança, todas as quatro subespécies apresentam similaridade de efeito tóxico, pois são estatisticamente semelhantes.

É interessante mencionar que as subespécies *sotto*, *kurstaki* e *aizawai* estão relatadas como tóxicas a insetos da ordem Lepidoptera, entretanto a subespécie *fukuokaensis* está associada a toxicidade a Dípteros (GUERCHICOFF et al., 2001;

YU et al., 1991). Este é portanto o primeiro relato da atividade da subespécie *fukuokaensis* a um inseto da ordem Lepidoptera.

Tabela 3. Resultados dos bioensaios de dose, realizado com as subespécies que mataram acima de 70% das larvas em bioensaios seletivos contra *Spodoptera frugiperda*. Sendo CL₅₀: concentração letal para 50% da população.

Estirpe	CL₅₀ (ng/cm²)
<i>fukuokaensis</i> (S608)	0,55 (0,16 – 1,12)
<i>sotto</i> (S615)	1,04 (0,63 – 1,65)
<i>kustaki</i> (S1450)	1,34 (0,84 – 2,06)
<i>aizawai</i> (S1576)	0,82 (0,39 – 10,87)

Conclusões

Este trabalho mostrou que a lagarta-do-cartucho-do-milho, *S. frugiperda* é altamente susceptível as quatro subespécies de *B. thuringiensis*, *fukuokaensis*, *sotto*, *kurstaki* e *aizawai*.

Novos bioinseticidas são importantes no Manejo Integrado de Pragas (MIP), no manejo de resistência de insetos a inseticidas e na preservação dos inimigos naturais. Com diferentes produtos formulados é possível fazer a rotação de produtos contendo diferentes estirpes de *Bacillus thuringiensis*.

Referências Bibliográficas

CRICKMORE, Neil. ***Bacillus thuringiensis* Toxin Gene Nomenclature**. Disponível em: < http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/ >. Acesso em: maio 2001.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. de L. C.; MATOSO, M. J. **Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 1999. 40 p.

DE BARJAC, H.; BONNEFOI, A. Essai de classification biochimique et serologique de 24 souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*. **Entomophaga**, v. 7. p. 5-31, 1962.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.

GUERCHICOFF, A; DELECLUSE, A.; RUBINSTEIN, C. The *Bacillus thuringiensis* cyt toxins Genes for Hemolytic Endotoxins Constitute a Gene Family. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 3, p. 1090-1096, 2001.

MEREGE, W. H. **Milho (Zea mays L.)**. disponível em: < <http://www.agrobyte.com.br/milho.htm> >. Acesso em: 04 maio 2001.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; SILVA-WERNECK, J. O. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 65 p.

SCHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R. G.; BORGES, M.; CARVALHO, R. **Metodologia de criação de insetos para a avaliação de agentes entomopatogênicos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 11).

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potencial as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, n. 3, p. 315-343, 1984.

YU, Y. M.; OHBA, M.; GILL, S. S. Characterization of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subespecie *fukuokaensis* crystal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 4, p. 1075-1081, 1991.