

influenciado a alta incidência das larvas da bicheira-da-raiz. Por exemplo, Prando (1999) encontrou 2 espécies de coleóptero da família Dytiscidae predador de larvas da bicheira-da-raiz, bem maiores que as larvas da bicheira, que vivem na superfície do lodo, e ao contrário das larvas da bicheira que vivem abaixo da rede de raízes das plantas de arroz, são alvos mais fáceis para os peixes. De acordo com Moreira (1996), 15 dias após o plantio foram encontrados cerca de 30 ovos/planta, e aos 60 dias, mais de 75 ovos/planta. Portanto, quando são colocados os peixes, aproximadamente 3 semanas depois da semeadura, as larvas da bicheira já estão fixadas nas raízes e não ficam vulneráveis à predação. O nível mais alto de água utilizado na rizipiscicultura também favorece a bicheira porque, de acordo com Moreira (1996), quanto maior a profundidade da água maior será a incidência da bicheira. Em ensaios realizados por Sato e Prando (2000), foram observados que tanto os alevinos da tilápia do Nilo como os da carpa comum, somente as maiores de 10g, consumiram mais de 100 adultos da bicheira-da-raiz/peixe, em menos de 2 horas. Ao nosso ver, uma das formas de minimizar o ataque da bicheira-da-raiz é povoar com alevinos de 10 a 20g, por ocasião da semeadura do arroz, para permitir que os peixes se alimentem dos adultos e também das larvas de primeiro estágio, antes que elas se fixem nas raízes de plantas jovens. E também como manejo integrado de pragas, mais no sentido de convencer o agricultor a eliminar ou reduzir o uso de agrotóxicos em seu benefício e, do meio ambiente.

A média do número de pupas não ultrapassou de 5 em todos os tratamentos (Fig.2), sendo que a maior ocorreu no D1P1SA com 4,5 pupas e a menor no D2P2 com 1,3 pupas.

A análise econômica efetuada demonstrou que a rizipiscicultura, ensejou um lucro equivalente a 29,5% da produção do arroz (Sato e Castagnolli, 1999). Se levarmos em consideração que o peixe ainda contribui no controle de plantas daninhas e de insetos, a rizipiscicultura é um empreendimento viável.

Nas condições do experimento pode-se concluir que o peixe auxilia no aumento da produtividade do arroz, independentemente da densidade e das proporções de espécies utilizadas, mas não controla satisfatoriamente a bicheira-da-raiz. Entretanto, outros experimentos com diferentes tamanhos e espécies de peixes devem ser conduzidos para que se possa avaliar melhor a influência do peixe.

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

- MOREIRA, G.R.P. Efeito da profundidade da água e idade da planta de arroz irrigado na seleção do local de oviposição por *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 21., 1996. **Resumos..** Porto Alegre: URS, p.128. 1996.
- NOLDIN, J.A. **Criação de peixes em lavoura de arroz irrigado.** Florianópolis: EMPASC, 1982. 3p. (EMPASC. Pesquisa em Andamento, 1)
- PERIN, L.C. **Apostila sobre rizipiscicultura para o curso de aprimoramento técnico em piscicultura.** Camboriú, ACARPESC, 1985. Datilografado e não publicado.
- PRANDO, H.F. Ocorrência de inimigos naturais de larvas de primeiro estágio de *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima 1936) Col. Curculionidae, em Itajaí. In: Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 1; Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, 23, 1999. Pelotas. **Anais..** Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado. p. 429, 1999.
- SATO, G. e CASTAGNOLLI, N. Produção de alevinos-II na rizipiscicultura. In: Acuicultura Venezuela 99. Puerto La Cruz, Venezuela. 1999. **Anais...World Aquaculture Society/LAC; Sociedade Venezuelana de Acuicultura; United Soybean Board; American Soybean Association.** Puerto La Cruz, p. 440-452. 1999.
- SATO, G. e PRANDO, H.F. Bioensaio realizado no laboratório do Campo Experimental de Piscicultura de Camboriú. 2000 (não publicado).

PATOGENICIDADE DE *BACILLUS THURINGIENSIS* ÀS LARVAS DE *ORYZOPHAGUS ORYZAE* (COL., CURCULIONIDAE), EM LABORATÓRIO

Cristiano Steffens¹, Aline Oliboni de Azambuja¹, Laura Massochin Nunes Pinto¹, Jaime Vargas de Oliveira², Valmir Gaedke Menezes² & Lidia Mariana Fiuza^{1,2} ¹Microbiologia, Centro 2, Universidade do Vale do Rio dos Sinos. C.P. 275, CEP 93001-970, São Leopoldo, RS. ²EAA/Instituto do Rio-grandense do Arroz. C.P. 29, CEP 94930-030, Cachoeirinha, RS. E-mail: fiuza@cirrus.unisinos.br

Na agricultura mundial e mais especificamente na agricultura gaúcha, a cultura do arroz destaca-se tanto pela importância econômica e comercial, quanto pela área de cultivo. Entre os fatores adversos ao cultivo e a produção de grãos, destacam-se os insetos-praga, sendo que as ordens Lepidoptera e Coleoptera compreendem o maior número de pragas agrícolas (GALLO *et al.*, 1988).

Na cultura do arroz irrigado, a principal praga é o *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae), ocasionando danos econômicos dentro de um curto espaço de tempo. Em lavouras implantadas através da semeadura em solo seco, o inseto adulto, conhecido como "gorgulho aquático" raramente acarreta perdas econômicas, apenas alimenta-se das folhas e oviposita nas partes submersas das plantas de arroz. Ao contrário, em lavouras onde são usadas sementes pré-germinadas, o inseto adulto alimenta-se intensamente de plântulas, podendo afetar economicamente à cultura. Contudo, os principais danos de *O. oryzae* correspondem a alimentação das larvas (bicheira-da-raiz), no sistema radicular, reduzindo a capacidade de absorção de nutrientes e resultando em perdas de produtividade de 10 a 30% (MARTINS, 1990; OLIVEIRA, 1994; PRANDO, 1999).

Práticas culturais tradicionais do manejo da cultura do arroz irrigado como destruição da resteva, limpeza de canais de irrigação e aplainamento do solo, contribuem para reduzir os danos causados por *O. oryzae*. Entretanto, quando tais práticas são insuficientes para impedir a ocorrência de níveis populacionais, economicamente prejudiciais à cultura, a principal alternativa de controle tem sido o uso do inseticida Carbofuram granulado, distribuído em cobertura, na água de irrigação, visando atingir as larvas (MARTINS *et al.*, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 1995). Considerando os inseticidas químicos, existem restrições ao uso desse produto devido à alta toxicidade, custo relativo elevado e dificuldade para distribuição uniforme via aérea. Além disso, o uso do Carbofuram para controle de gorgulhos aquáticos, na cultura do arroz, vem sendo proibido no Japão e está sendo questionado nos Estados Unidos da América. Sendo assim, faz-se necessário desenvolver métodos alternativos ao controle químico.

No controle microbiano de insetos-praga, *Bacillus thuringiensis* tem sido o entomopatógeno mais utilizado na escala mundial (ALVES, 1998). Sendo assim, esse agente de controle biológico é o mais promissor, tanto do plano das aplicações atuais quanto das perspectivas de desenvolvimento (FIUZA, 1995). As cepas de *B. thuringiensis*, atualmente classificadas e caracterizadas, são constituídas de toxinas específicas contra formas jovens de lepidópteros, dípteros e coleópteros. Também já foi mencionada a existência de toxinas ativas contra nematóides, protozoários e ácaros (SCHNEPF *et al.*, 1998). Por outro lado, ainda existem inúmeros isolados de *B. thuringiensis*, para os quais a atividade inseticida ainda é desconhecida.

Nesse contexto, a análise entomocida das delta-endotoxinas *Cry* já caracterizadas, assim como os estudos relacionados aos novos isolados de *B. thuringiensis*, são considerados de grande relevância para o controle microbiano do inseto-praga alvo em estudo, responsável por perdas significantes à produção de arroz irrigado. Assim sendo, o presente trabalho objetivou a análise *in vivo* da patogenicidade de um novo isolado de *B. thuringiensis* às larvas de *O. oryzae*, em condições laboratoriais, o qual deverá posteriormente ser testado em casa de vegetação e campo.

A dificuldade de métodos de bioensaios adequados aos testes de patogenicidade de *B. thuringiensis* contra as larvas de *O. oryzae* tem sido o problema de diversos pesquisadores que atuam nesta área, sendo assim na presente pesquisa foi adaptada uma técnica à realização desses ensaios *in vivo*.

As larvas e as plântulas de arroz foram coletadas em lavouras da EEA do IRGA (Cachoeirinha, RS), sendo em seguida levadas ao laboratório e acondicionadas em tubos de

ensaio, testando inicialmente sua adaptabilidade em diferentes soluções: Meio Yoshida, água potável, água da lavoura e água destilada. Para verificar a ingestão da solução pelas larvas, adicionou-se a essas o corante Coomassie Blue (CB), às concentrações de 10, 5, 2 e 1%. Os ensaios foram mantidos em câmara B.O.D., a 28°C, 80% de umidade relativa e fotofase de 16 horas.

Os resultados revelaram que as larvas apresentam maior longevidade quando foi utilizada a “água da lavoura”, estando esta associada à concentração de 2% de CB. As larvas tratadas foram dissecadas quatro dias após a aplicação dos tratamentos, revelando a presença do corante no sistema digestivo, comprovando assim a ingestão das soluções utilizadas nos tratamentos. Os dados revelaram o referido método de bioensaio como adequado aos testes de patogenicidade de *B. thuringiensis* contra as larvas de *O. oryzae*.

Nos bioensaios, com o novo isolado *B. thuringiensis* 2014-2, as larvas de *O. oryzae* foram coletadas, entre janeiro e maio de 2001, em parcelas de arroz da EEA do IRGA (Cachoeirinha, RS). No laboratório, as larvas foram distribuídas em 8 tubos de ensaio à proporção de 5 larvas/tubo, correspondendo a 40 larvas por experimento e 3 repetições, totalizando 120 larvas por tratamento (Figura 1).

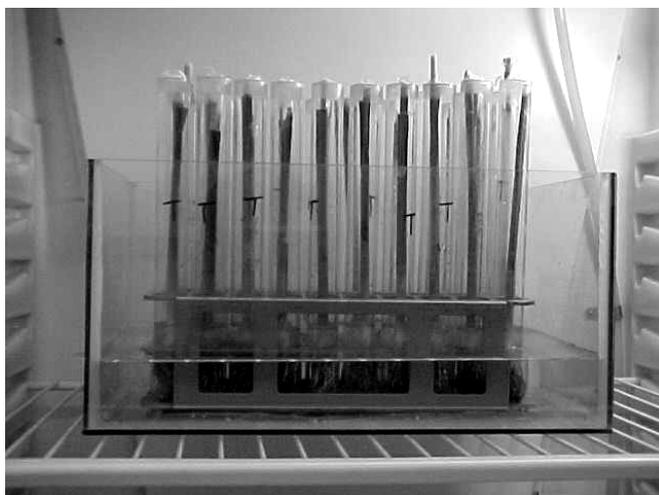


Figura 1 - Bioensaios de *Bacillus thuringiensis* contra as larvas de *Oryzophagus oryzae*, em laboratório, IRGA e UNISINOS, RS, 2000-2001.

O isolado de *B. thuringiensis* foi inoculado em erlenmeyers contendo Meio Usual Glicosado, acondicionados em Shaker, a 180 rpm, e 30°C, durante 48 horas. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 4500 rpm, durante 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado e a mistura (contendo as células bacterianas, os cristais e os endósporos) recuperada em água destilada esterilizada. Na contagem dos endósporos, retirou-se uma alíquota da suspensão bacteriana, a qual foi diluída (à proporção de 1/100 e 1/1000) e aplicada na Câmara de Neubauer, sendo a contagem efetuada com auxílio de microscópio óptico. No bioensaio foi utilizada a concentração final de 8.10^{10} endósporos/mL para o isolado *B. thuringiensis* 2014-2. A suspensão foi aplicada em tubos de ensaio, contendo 8 mL de água da lavoura e Tween 20, plântulas de arroz e larvas de *O. oryzae*. Nos tubos correspondente a testemunha, a suspensão bacteriana foi substituída por água da lavoura e Tween 20. Os tratamentos foram acondicionados em câmara tipo B.O.D., com fotofase de 12 horas, a 25°C e 80% de umidade relativa,

A mortalidade foi observada 7 dias após a aplicação dos tratamentos, sendo a mortalidade corrigida calculada pela fórmula de ABBOT (1925), e o valor médio obtido para o tratamento correspondente ao isolado de *B. thuringiensis* 2014-2 equivalente a 53,41%. Os resultados revelam a especificidade do entomopatógeno *B. thuringiensis* 2014-2 à fase imatura do inseto-praga alvo. O referido isolado foi obtido através do isolamento de

bactérias a partir de amostras de solos coletadas em diferentes áreas de arroz irrigado do Rio Grande do Sul. As análises moleculares, preliminares, do isolado em estudo revelam a presença de genes *cry3* que codificam delta-endotoxinas específicas aos insetos da ordem Coleoptera, confirmando assim os resultados de patogenicidade observados nos bioensaios.

As próximas etapas dessa pesquisa correspondem a purificação das proteínas sintetizadas pelo novo isolado *B. thuringiensis* 2014-2 e a determinação da Concentração Letal Mediana (CL₅₀), que indica a toxicidade e a viabilidade da utilização do isolado como biopesticida ou dos genes *cry* na obtenção de plantas resistentes às larvas de *O. oryzae*, sendo a última viável através da engenharia genética de plantas ou pelo processo de mutagênese.

Apoio: EEA-IRGA e UNISINOS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOT, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness insecticide. *J. Ec. Ent.* **18**: 265-67.
- ALVES, Sérgio Batista. "Controle Microbiano de Insetos". 2 ed. FEALQ. Piracicaba, São Paulo, BR. 1163p. 1998.
- FIUZA, L.M. 1995. Etude des sites récepteurs et de la toxicité des delta-endotoxines de *Bacillus thuringiensis* Berliner chez les larves de la Pyrale du riz, *Chilo suppressalis* Walker. *Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques*, ENSA-M, Montpellier, France.vol. I. 180p.
- GALLO, Domingos; NAKANO, Octávio; SILVEIRA NETO, Sinval; CARVALHO, Ricardo Pereira Lima; BATISTA, Gilberto Casadei; BERTI FILHO, Evoneo; PARRA, José Roberto Postali; ZUCCHI, Roberto Antônio; ALVES, Sérgio Batista; VENDRAMIM, José Djair. "Manual de Entomologia Agrícola". ESALQ. 2 ed. Ed. Agronômica Ceres Ltda. Piracicaba, São Paulo, BR. 649p. 1988.
- MARTINS, J. F. da S. 1990. Problemática da bicheira-da-raiz no Rio Grande do Sul. Reunião Nacional de pesquisa de Arroz, 4 GO, 1990. *Resumos...*, EMBRAPA-CNPAF, p.29.
- MARTINS,J.F. da S.; TERRES, A. L. S. & BOTTON, M. 1993. Alternativas de controle da bicheira-da-raiz visando menor impacto ambiental. *Lav. Arroz.*, 46:12-14.
- OLIVEIRA, J. V. de . 1994. Controle químico de bicheira da raiz (*Oryzophagus oryzae*, Costa Lima, 1936) em arroz irrigado. Porto Alegre, RS. *Lavoura Arrozeira*, 47 (413): 3-4.
- OLIVEIRA ,J. V. de. 1995. Controle químico da bicheira da raiz *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima, 1936) em arroz irrigado. *Reunião da Cultura do Arroz Irrigado*, 21, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, RS, IRGA, 1995, p.201-202.
- PRANDO, H. F. 1999. Aspectos bioecológicos e de controle de *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima,1936) (Coleoptera, Curculionidae) em arroz irrigado, sistema de cultivo pré-germinado. *Tese de Doutorado*. PPGCB, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 100p.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VANRIE, J; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R. & DEAN, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 62:775-806.