

84. TOXICIDADE DE PROTEÍNAS CRY1 DE *BACILLUS THURINGIENSIS* PARA *ORYZOPHAGUS ORYZAE* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EM LABORATÓRIO

Laura Massochin Nunes Pinto^{1,2}, Natália Dörr², Jaime Vargas de Oliveira³ e Lidia Mariana Fiuza^{2,3}

Palavras-chave: entomopatígeno, controle biológico, bicheira-da-raiz.

INTRODUÇÃO

No Brasil, *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima, 1936) é considerado a principal praga da cultura do arroz (Martins & Prando, 2004). Os prejuízos causados por *O. oryzae* são oriundos principalmente do ataque das larvas às raízes das plantas, onde abrem galerias causando redução do sistema radicular e da absorção de nutrientes, e o conseqüente desenvolvimento inadequado das plantas. Os adultos alimentam-se dos parênquimas das folhas, onde deixam orifícios da largura de suas mandíbulas. Os cultivares precoces tendem a ser mais danificados que os tardios. Em arrozais plantados há mais tempo, podem causar prejuízos variáveis de 20 a 30% (Carbonari *et al.*, 2000).

Práticas tradicionais de manejo da cultura do arroz irrigado, como destruição de restos culturais, limpeza de canais de irrigação e aplainamento do solo, reduzem as populações de *O. oryzae*. Entretanto, tais práticas, ocasionalmente, não são suficientes para evitar níveis de infestação larval economicamente prejudiciais à cultura, tornando necessária a adoção do controle químico, acarretando assim o aumento do custo de produção e dos riscos de contaminação ambiental (Carbonari *et al.*, 2000).

Na busca por alternativas ao controle desta praga para reduzir os danos deste inseto à cultura, surgem as proteínas Cry da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*, as quais exibem alta atividade específica contra insetos devido a presença de delta-endotoxinas entomocidas. Estas toxinas são sintetizadas pelos genes *cry*, os quais podem ser utilizados para a obtenção de plantas resistentes a insetos-alvo.

Sendo assim, a presente pesquisa objetivou avaliar através de bioensaios a ação entomopatogênica de cepas de *B. thuringiensis*, com diferentes proteínas Cry, contra larvas de *O. oryzae*.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram avaliadas cinco cepas de *B. thuringiensis*, provenientes do Instituto Pasteur (Paris, França). Para os bioensaios com *O. oryzae*, as cepas foram cultivadas em meio usual glicosado, a 180 rpm e 30°C, até 90% de lise celular. Em seguida passaram por duas etapas de centrifugação, a 5000 rpm, por 20 minutos, sendo o *pellet* ressuscitado com água destilada estéril.

A determinação e padronização da concentração, a 1×10^9 células/mL para as cinco cepas bacterianas, foi realizada com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico. Os experimentos foram realizados conforme Pinto & Fiuza (2003) utilizando-se tubos de ensaio, cada um contendo 16mL da suspensão bacteriana e cinco larvas de 3º instar de *O. oryzae*, correspondendo a 40 insetos testados por tratamento. Em seguida foi acondicionada uma planta de arroz desinfetada, com as raízes totalmente submersas na suspensão, sendo os tubos de ensaio fechados parcialmente com filme plástico, acondicionados em estantes e com o fundo envolto em papel alumínio.

Os ensaios foram constituídos de seis tratamentos, com duas repetições, totalizando 240 insetos, sendo que na testemunha, as suspensões bacterianas foram substituídas por água destilada esterilizada.

Os experimentos foram conduzidos em câmara tipo B.O.D., a 25°C, com fotofase de 12 horas, durante sete dias, quando então a mortalidade das larvas foi avaliada e corrigida segundo a fórmula de Abbott.

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia, Doutorado, UNISINOS, Ciências da Saúde - Lab. de Microbiologia, Av. Unisinos, 950 - CEP 93022-000 São Leopoldo, RS-Brasil. laurampn@yahoo.com.br. ²Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS. ³Estação Experimental do Arroz, IRGA, Cachoeirinha, RS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados revelam que as cepas de *B. thuringiensis* avaliadas no presente estudo são efetivas contra as larvas de *O. oryzae*, sendo que *B. thuringiensis dendrolimus* HD-37 demonstrou ser a mais patogênica, ocasionando 83,1% de mortalidade corrigida, seguida por *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 (recombinante) com 76,8% de mortalidade corrigida (Tabela 1), as quais sintetizam as proteínas entomopatogênicas Cry1Aa e Cry1Ab, respectivamente.

Tabela 1. Toxicidade de proteínas Cry1 de *Bacillus thuringiensis* às larvas de *Oryzophagus oryzae*.

Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)	Genes cry	Média de mortalidade corrigida (%) (Abbott, 1925)
<i>Bt dendrolimus</i> HD-37	<i>cry1Aa</i>	83,1
<i>Bt kurstaki</i> HD-1 (recombinante)	<i>cry1Ab</i>	76,8
<i>Bt thuringiensis</i> 4412	<i>cry1Ba</i>	55,3
<i>Bt entomocidus</i> 60.5 (recombinante)	<i>cry1C</i>	53,1
<i>Bt kurstaki</i> HD-73	<i>cry1Ac</i>	51,6

A análise dos resultados demonstra que as proteínas da família Cry1A, mesmo que inicialmente designadas como tóxicas para lepidópteros (Hofte & Whiteley, 1989), também podem ser efetivas para coleópteros (Lorence-Quiñones & Quintero-Ramírez, 1996; Porcar & Caballero, 2001).

Pinto *et al.* (2003) isolaram uma cepa de *B. thuringiensis* de áreas orizícolas do Rio Grande do Sul, que apresentou 100% de mortalidade corrigida para *O. oryzae*. Esta cepa teve os genes Cry1 e Cry3 identificados por PCR. Grossi-de-Sa *et al.* (2007) identificaram toxicidade da proteína Cry1Ia12 para o coleóptero *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), obtendo 50% de mortalidade com a concentração de 230 µg/mL de proteína purificada.

Diferenças na atividade proteolítica entre insetos sensíveis podem levar a diferentes níveis de especificidade, as quais podem ser atribuídas a fisiologia dos intestinos de diferentes organismos. Há muitos indícios de envolvimento de proteases do intestino médio para determinar a suscetibilidade de um inseto às toxinas-Bt. Por exemplo, as proteinases digestivas de lepidópteros e dípteros são principalmente serino proteases, enquanto as de coleópteros são principalmente cisteína e aspártico proteases (Maagd *et al.*, 2001; López-Pazos *et al.*, 2009).

As toxinas Cry de três domínios incluem proteínas tóxicas à insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e Hymenoptera, bem como nematóides. Estas protoxinas geralmente apresentam dois tamanhos diferentes, cerca de 130 ou 70 kDa (Schnepf *et al.*, 1998).

O alinhamento de sequências de toxinas ativadas revelou a presença de até cinco blocos conservados, sendo proposto que proteínas que possuíssem estas regiões conservadas também compartilhariam estruturas similares. As estruturas das toxinas Cry1Aa, Cry3Aa e Cry3Bb ativadas e uma pequena protoxina Cry2Aa foram determinadas e confirmadas como muito semelhantes (Grochulski *et al.*, 1995; Galitsky *et al.*, 2001). Estes dados corroboram com os resultados obtidos na presente pesquisa, pois a proteína Cry1Aa mostrou-se a mais ativa para o coleóptero avaliado, proteína esta que é semelhante às proteínas Cry3, anteriormente descritas pela atividade inseticida a ordem Coleoptera.

Os genes *cry1* avaliados no presente estudo poderão ser utilizados na obtenção de plantas resistentes às larvas de *O. oryzae*, através da engenharia genética, as quais poderão ser utilizadas na implementação do Manejo Integrado de Pragas da cultura do arroz irrigado.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho de pesquisa inferem o potencial das proteínas Cry1 no controle de *Oryzophagus oryzae*. Os dados indicam o elevado potencial dos genes *cry1Aa* e *cry1Ab* na obtenção de plantas de arroz-Bt resistentes às larvas de *O. oryzae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W. S., 1925, A method of computing the effectiveness of insecticide. **Journal of Economic Entomology**. Lanham. v. 18. p. 265-67.
- CARBONARI, J.J. *et al.* Relação entre flutuação populacional de *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima) (Coleoptera: Curculionidae) e período de perfilhamento de cultivares de arroz irrigado. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina. n. 29, v. 2, p. 361-366, 2000.
- GALITSKY, N. *et al.* Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**. Chester. n. 57, p. 1101-1109, 2001.
- GROCHULSKI, P. *et al.* *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin-crystal structure and channel formation. **Journal of Molecular Biology**, n. 254, p. 447-64, 1995.
- GROSSI-DE-SA, M.F. *et al.* Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a CryIIa-type Toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* Strain. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. Seoul. n. 40, v. 5, p. 773-782, 2007.
- HOFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington. n. 53, p. 242-255, 1989.
- LÓPEZ-PAZOS, S.A.; GÓMEZ, J.E.C.; SALAMANCA, J.A.C. Cry1B and Cry3A are active against *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. Marceline. 2009. [ARTICLE IN PRESS].
- LORENCE-QUIÑONES, A.; QUINTERO-RAMÍREZ, R. Mecanismo molecular de acción de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. In **Avances Recientes en la Biotecnología en *Bacillus thuringiensis*** ED. GALÁN-WONG, L., RODRÍGUEZ-PADILLA, C. AND LUNA-OLVERA, H. pp. 63-113. Monterrey, México: Universidad Autónoma de Nuevo León, 1996.
- MAAGD, R. A. DE; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, Oxford. n. 17, p. 193-199, 2001.
- MARTINS, J.F. da S.; PRANDO, H.F. Bicheira-da-raiz do arroz. In: SALVADORI, J.R.; ÁVILA, C.J.; SILVA, M.T.B. da (eds.), **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz Alta: Fundacep Fecotrigo, 2004. Cap.9, p.259-296.
- PINTO, L.M.N.; FIUZA, L.M. PCR screening of *Bacillus thuringiensis* cry genes specific to lepidopterans and coleopterans. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo. v. 34. p. 305-310, 2003.
- PORCAR, M.; CABALLERO, P. Diversidad genética de *Bacillus thuringiensis*. In **Bioinsecticidas: Fundamentos y Aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el Control Integrado de Plagas** ed. PRIMITIVO, C. AND FERRE, J. p. 45-69. Spanha: Universidad Pública de Navarra. Phytoma, 2001.
- SCHNEPF, E. *et al.* 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and molecular biology reviews**. Washington. v. 62. n. 3. p. 775-806.