

## EFEITO LETAL DAS PROTEÍNAS CRY1Ab E CRY1Ac DE *BACILLUS THURINGIENSIS* ÀS LAGARTAS DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE).

Neiva Knaak<sup>1</sup>, Andréa Rovere Franz<sup>1</sup>, Jaime Vargas de Oliveira<sup>2</sup> & Lidia Mariana Fiuza<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>UNISINOS - PPG em Biologia, Microbiologia, São Leopoldo, RS. (fiuza@unisinós.br) <sup>2</sup>IRGA - EEA, Cachoeirinha, RS, Brasil.

A produção agrícola tem evoluído e os avanços da ciência têm fundamentado tecnologias diversas, permitindo o aumento na produção agrícola. Apesar desses avanços, os insetos causam danos nas plantas cultivadas, comprometendo o processo produtivo, onde se destacam os ataques das pragas fitófagas que causam significativa redução na produtividade orizícola. Entre esses fitófagos encontra-se o lepidóptero da família Noctuidae, *Spodoptera frugiperda* (SOSBAI, 2005).

No Rio Grande do Sul, a infestação dessa praga faz com que os produtores utilizem inseticidas de forma preventiva, podendo provocar a resistência dos insetos a essas moléculas sintéticas, além de impactos ambientais. Sendo assim, o agravamento destes problemas ambientais tem levado os pesquisadores à procura de alternativas para amenizar os efeitos prejudiciais dos produtos químicos, através da racionalização da sua aplicação (CARLINI et al., 2002).

No controle biológico, as bactérias do gênero *Bacillus* possuem um grande potencial inseticida para aplicação no manejo integrado de pragas, pois mantém sua viabilidade quando estocados por longos períodos (ALVES, 1998). O entomopatógeno *Bacillus thuringiensis*, tem obtido sucesso em escala comercial para o controle de vários insetos-praga nos últimos 50 anos (SCHNEPF et al., 1998), esta é uma bactéria Gram-positiva que produz inclusões cristalinas durante a esporulação, sendo estas compostas de proteínas Cry inseticidas (HOFMANN et al., 1998; VAN RIE et al., 1990).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade das cepas e proteínas Cry de *B. thuringiensis thuringiensis* 407 (pH 408) e *B. thuringiensis kurstaki* HD73 contra a lagarta-da-folha, *S. frugiperda*.

As lagartas de *S. frugiperda* foram coletadas em áreas de arroz irrigado, na EEA/IRGA (Cachoeirinha, RS) e mantidas em laboratório, sendo alimentadas com dieta de Poitout (POITOUT e BUES, 1970). O ciclo biológico foi desenvolvido em condições controladas (25°C, 12 horas de fotofase e 70% de Umidade Relativa), na sala de Criação de Insetos na UNISINOS.

As cepas de *B. thuringiensis thuringiensis* 407 (pH 408) e *B. thuringiensis kurstaki* HD-73 foram cedidas pelo *International Entomopathogenic Bacillus Centre*, do Instituto Pasteur de Paris (França). Essas cepas foram crescidas em meio usual glicosado, a 180 rpm e 28°C por 48 horas (DEBARJAC e LECADET, 1976). Em seguida, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 5000 rpm e a contagem de células foi realizada em Câmara de Neubauer e microscopia óptica, sendo a concentração ajustada em  $1.10^{10}$  Células/mL.

No preparo das proteínas Cry, o cultivo das duas cepas foi efetuado conforme descrito anteriormente até a obtenção de 90% de lise celular. A cultura foi centrifugada a 5000 rpm, 5°C, durante 15 min, e o concentrado obtido foi lavado com tampão fosfato (0,1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  + 0,1M NaCl, pH 6,0). A separação dos esporos, cristais e resíduos celulares foi realizada através da aplicação da suspensão bacteriana no gradiente descontínuo de sacarose (67 - 79%), o qual foi centrifugado a 9500 rpm, a 5°C, durante uma hora. As bandas depositadas entre as diferentes concentrações de sacarose foram coletadas, lavadas com água mili-Q e observadas em microscopia de contraste de fase. Sendo, em seguida, as proteínas solubilizadas em tampão fosfato pH 10 (50mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 10mM DTT, 5mM EDTA, 0,1mM PMSF) conforme descrito por FIUZA et al. (1996). A concentração protéica foi determinada de acordo com o método de BRADFORD (1976) e o perfil foi avaliado em SDS-PAGE, a 10% (LAEMMLI, 1970).

As proteínas Cry1Ab e Cry1Ac foram testadas em lagartas de 1º instar de *S. frugiperda*. Para cada proteína, os ensaios foram constituídos de 5 concentrações protéicas (0,06 a 610  $\mu\text{g/mL}$  e 0,1 a 1050  $\mu\text{g/mL}$ , para Cry1Ab e Cry1Ac, respectivamente) e uma testemunha, representando 6 tratamentos de 30 insetos e 3 repetições, totalizando 540

insetos avaliados por proteína. Os tratamentos foram aplicados (100µL) na superfície da dieta de Poitout, previamente acondicionadas em mini-placas de acrílico, onde as lagartas foram individualizadas. Nas testemunhas, as proteínas foram substituídas por água destilada e esterilizada. Os ensaios foram mantidos em câmara climatizada a 25°C, 70% de UR e 12h de fotofase. A mortalidade foi avaliada até o sétimo dia após a aplicação dos tratamentos, sendo em seguida corrigida pela fórmula de Abbott (1925). As concentrações letais médias (CL<sub>50</sub>) de cada proteína à espécie alvo foi determinada pela Análise de Probit, usando o programa Polo-PC LeOra Software, 1987 (HADDAD, 1998). Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância e teste de Tukey (P<0,05) para comparação entre as médias.

Nessa pesquisa, os dados da toxicidade das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac, sintetizadas por *B. thuringiensis thuringiensis* 407 (pH 408) e *B. thuringiensis kurstaki* HD-73, respectivamente, revelaram Concentrações Letais Médias (CL<sub>50</sub>) de 9,29 e 1,79 µg/cm<sup>2</sup> às lagartas de 1º instar de *S. frugiperda* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Concentração Letal Média das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* às lagartas de 1º instar de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae).

Tratamentos	Proteínas (µg/cm <sup>2</sup> )		
	CL <sub>50</sub>	IC (Li-Ls)*	χ <sup>2</sup>
Proteína Cry1Ab	9,29	4,34-28,46	1,59
Proteína Cry1Ac	1,79	0,96-3,76	1,08

\*IC - Intervalo de Confiança, calculado a 95% de probabilidade através da Análise de Probit; Li=limite inferior; Ls=limite superior.

PRAÇA et al. (2004) selecionando cepas de *B. thuringiensis* efetivas contra as lagartas de 2º instar de *S. frugiperda* compararam novas cepas ao *B. thuringiensis kurstaki* HD1 (CL<sub>50</sub> de 0,285 µg/cm<sup>2</sup>), obtendo CL<sub>50</sub> de 0,09 e 0,52 µg/cm<sup>2</sup>, respectivamente para S234 e S997, as quais revelaram elevada toxicidade à espécie-alvo. Já nas pesquisas de ARANDA et al. (1996), com *S. frugiperda*, os dados de CL<sub>50</sub> das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac foram superiores a 2 µg/cm<sup>2</sup>, cujos valores diferem em parte do presente estudo onde a proteína Cry1Ac (1,79 µg/cm<sup>2</sup>) foi significativamente mais tóxica à espécie-alvo quando comparada à proteína Cry1Ab (9,29µg/cm<sup>2</sup>).

MENG et al. (2003) calcularam a CL<sub>50</sub> das proteínas Cry1Ac e Cry1Ab, oriundas de produtos comerciais de *B. thuringiensis*, para larvas neonatas de *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera, Pyralidae), as quais foram de 15 a 157 mg (AI)/L e 2 a 34 mg (AI)/L, respectivamente. Por outro lado, FIUZA et al. (1996) testando proteínas de Cry1 de *B. thuringiensis* em lagartas de 2º instar de *C. suppressalis*, verificou que a CL<sub>50</sub> para Cry1Ac foi de 2,24 µg/cm<sup>2</sup> cujos resultados assemelham-se ao presente estudo também realizado com a ordem Lepidoptera e família de proteínas cry1.

Os resultados desse trabalho confirmam que as cepas e proteínas sintetizadas por *B. thuringiensis thuringiensis* 407 (pH 408) e *B. thuringiensis kurstaki* HD-73 são eficientes no controle de *S. frugiperda*, sendo que a proteína Cry1Ac foi mais efetiva. Nesse caso tanto o agente de controle microbiano pode ser usado na produção de biopesticidas quanto seus genes *cry* na engenharia genética de *Oryza sativa* L.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W. S. A Method of computing the effectiveness insecticides. *Journal Economic Entomology*, 18:265-267, 1925.
- ALVES, S. B. *Controle microbiano de insetos*. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998,1163p.
- ARANDA E.; SANCHEZ, J.; PEFERON, M.; GUERECA, L.; BRAVO, A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins with the Midgut Epithelial Cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal Invertebrate Pathology*, 68:203-212, 1996.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Biochemistry*, 72:248-254, 1976.

CARLINI, C. R.; Grossi-de-Sá, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40:1515-1539, 2002.

DEBARJAC, H.; LECADET, M.M. Dosage biochimique d'exotoxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* d'après l'inhibition d'ARN-polymerases bacteriennes. *C. R. Acad. Sci.*, 282:2119-2122, 1976.

FIUZA, L. M.; NIELSEN-LEROUX, C.; GOZÉ, R.; FRUTOS, R.; CHARLES, J. F. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae): Evidence of Shared binding sites. *Applied Environmental Microbiology*, 62:1544-1549, 1996.

GRÜTZMACHER, A. D.; MARTINS, J. F. S.; CUNHA, U. S. Insetos-pragas das culturas do milho e sorgo no agroecossistema de várzea. In: PARFITT, J.M.B. Produção de milho e sorgo em várzea. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000, p.87-102.

HADDAD, M. L. Utilização do Polo-PC para análise de Probit. In: Alves, S.B. Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba: FEALQ. 1998, p. 999-1013.

HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, H.; VANRIE, J.; JANSENS, S.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins is correlated with the presence of high affinity binding site in the brush border membrane of target insect midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:7844-7848, 1998.

LAEMMLI, U. K. Smaller sample vols are better. If using large vols make the stack gel bigger. *Nature*, 227, 689, 1970.

MENG, F.; WU, K.; GAO, X.; PENG, Y.; GUO, Y. Geographic variation in susceptibility of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins in China. *Journal Economic Entomology*, 96(6):1838-1842, 2003.

POITOUT, S.; BUES, R. Élevage de plusieurs espèces de Lépidopteres Noctuidae sur milieu artificiel riche et surmilieu simplifié. *Annales de Zoologie Ecologie Animale*, 2:79-91, 1970.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens lepidoptera, coleoptera e diptera. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39 (1):11-16, 2004.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticide crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biology Reviews*, 62:775-806, 1998.

SOSBAI; Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado; Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil; IV Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado; XXVI Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, 2005. Santa Maria, RS.

VAN RIE, J.; JANSEN, S.; HÖFTE, H.; DEGHEELED, D.; VAN MELLAERT, H. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. *Applied Environmental Microbiology*, 56:1378-1385, 1990.