

NOVOS ISOLADOS E PROTEÍNAS CRY DE *BACILLUS THURINGIENSIS* APLICADOS NO CONTROLE DE LAGARTAS DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA*

Diouneia Lisiane Berlitz ⁽¹⁾, Aline Oliboni de Azambuja⁽¹⁾, Ana Cristina Antonio⁽¹⁾, Jaime Vargas de Oliveira ⁽²⁾ & Lidia Mariana Fiuza ^(1,2). ¹UNISINOS – Lab. de Microbiologia - São Leopoldo, RS. E-mail: fiuza@bios.unisinis.br; dberlitz@cirrus.unisinis.br

²Instituto Riograndense do Arroz- EEA, Cachoeirinha, RS, Brasil.

Palavras-chave: bactéria entomopatogênica, lagarta militar, controle biológico, genes *cry*.

O arroz destaca-se por sua importância econômica e comercial, sendo largamente produzido por diversos países do mundo. No Brasil a produção de arroz em casca chega a 9,5 milhões de toneladas (Pinto *et al.*, 2003), sendo que, no Estado do Rio Grande do Sul há um constante aumento na área de cultivo (Weber *et al.*, 2003). Porém, ocorrem perdas na produtividade desta cultura devido ao ataque de pragas de diversas espécies.

Considerada um inseto-praga da fase inicial da cultura do arroz irrigado e também do arroz sequeiro, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) ataca as partes aéreas da planta, chegando a destruir completamente a cultura quando não irrigada (Alves, 1992). Nessa cultura os lepidópteros vêm sendo controlados através da aplicação de inseticidas químicos, os quais mostram-se poucos seletivos aos inimigos naturais, sendo esses responsáveis pelo alto impacto ambiental nas áreas de cultivo. Sendo assim, as bactérias entomopatogênicas são utilizadas como alternativa de controle biológico de insetos-praga.

Dentre estas, destaca-se *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), que se caracteriza pela produção de cristais durante a esporulação (Höfte & Whiteley, 1989). Estes cristais possuem toxinas que são ativadas no intestino médio de insetos susceptíveis. De acordo com a classificação dos genes *cry* de *B. thuringiensis*, as proteínas Cry codificadas por estes genes são divididas conforme sua atividade inseticida (Crickmore *et al.*, 1998). Com o objetivo de selecionar novos isolados e proteínas Cry dessa bactéria para aplicação no manejo de lepidópteros na orizicultura, foram realizados ensaios de seletividade *in vivo* e da análise de proteínas Cry *in vitro*.

Na pré-seleção as cepas de *B. thuringiensis* foram previamente isoladas de solo de regiões orizícolas do Rio Grande do Sul, e os isolados selecionados foram crescidos em meio usual glicosado por 48h, a 28° C e 180 rpm. Em seguida foram centrifugados a 5000 rpm por 15 min e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* bacteriano foi ressuscitado em água destilada esterilizada e foi realizada a contagem de células em Câmara de Neubauer e microscopia óptica. Para os ensaios *in vivo*, lagartas do 3° ínstar de *S. frugiperda* foram acondicionadas individualmente em mini-placas de acrílico contendo dieta artificial e 100 µL da suspensão bacteriana a 1.10¹⁰ células/mL. Na testemunha o tratamento foi substituído por água destilada e esterilizada. Nos bioensaios foram utilizados 20 insetos para cada tratamento. A mortalidade foi analisada no 7° dia após a aplicação dos tratamentos e corrigida pela fórmula de Abbott.

Os resultados da toxicidade dos 24 isolados testados mostraram que 58% foram patogênicos à espécie alvo, causando mortalidade corrigida entre 5% e 100% (Figura 1).

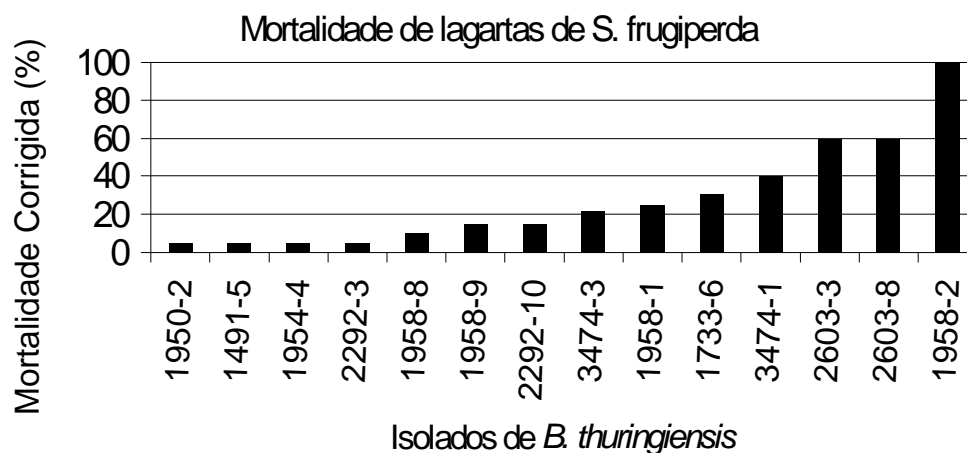


Figura 1. Toxicidade de novos isolados de *B. thuringiensis* em lagartas de 3º ínstar de *S. frugiperda*.

Os isolados que causaram mortalidade superior a 30% foram classificados de acordo com a sua região de origem, cujos dados encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Dados dos isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidos de amostras de solo das regiões orizícolas do RS, UNISINOS/IRGA, 2003.

Isolados	Região	Município	Textura	MO ¹	Ca ²	Mg ³	MC ⁴
<i>Bt</i> 1733-6	Dep. Central	Agudo	24	43	13,3	3,1	31,6%
<i>Bt</i> 3474-1	Dep. Central	Caçapava	24	61	5	2,2	40%
<i>Bt</i> 2603-3	Litoral	Capivari Sul	7	54	3,1	0,8	60%
<i>Bt</i> 2603-8	Litoral	Capivari Sul	7	54	3,1	0,8	60%
<i>Bt</i> 1958-2	Litoral	Arroio Grande	17	71	1,9	1,1	100%

(1)- Matéria orgânica; (2)- Cálcio; (3)- Magnésio; (4)- Mortalidade corrigida.

Conforme a Tabela 1, a cepa *Bt* 1958-2 mostrou 100% de efeito letal à espécie alvo. Considerando as características do solo da região de coleta desta amostra, foi observado uma maior concentração de matéria orgânica, e menor de Cálcio e Magnésio. Comparando estes dados com as demais regiões, constata-se uma pequena diferença nestes parâmetros. Devido a ausência de estudos a respeito da distribuição e da relação ecológica deste microrganismo, esses dados sugerem que a patogenicidade de novas cepas de *B. thuringiensis* pode estar relacionado com as características do solo, pois o mesmo representa o habitat natural do entomopatógeno.

Entre os 24 isolados avaliados, 10 não apresentaram efeito tóxico à lagarta-militar, sendo esses: *Bt* 1737-2, *Bt* 1732-12, *Bt* 1950-1, *Bt*1871-16, *Bt* 2612-1, *Bt* 1736-3, *Bt* 2049-3, *Bt* 1954-8, *Bt* 1871-1 e *Bt* 1871-2.

A análise do perfil das proteínas Cry, presentes nos novos isolados de *B. thuringiensis*, através de SDS-PAGE a 10% (Laemmli, 1970) encontram-se ilustradas na Figura 2.

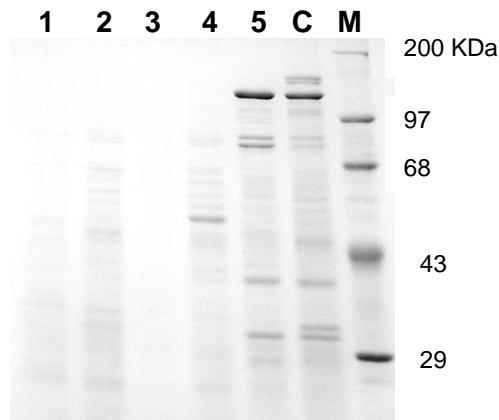


Figura 2. Perfil protéico em SDS-PAGE (10%) dos isolados de *Bacillus thuringiensis* com atividade inseticida contra lagartas de *Spodoptera frugiperda*. (M) Marcador de Peso Molecular, (1) *Bt* 1733-6, (2) *Bt* 3474-1, (3) *Bt* 2603-8, (4) *Bt* 2603-3, (5) *Bt* 1958-2, (C) *Bt aizawai*.

O isolado *Bt* 1958-2 que apresentou alto potencial inseticida será avaliado para a determinação da Concentração Letal Média (CL_{50}), a qual poderá ser utilizado para formulação de um bioinseticida, assim como serão purificadas as proteínas Cry cujo peso molecular predominante encontra-se entre 200 e 97kDa. Em seguida, também será determinada a CL_{50} para cada proteína sintetizada pelo isolado, as quais são codificadas por genes *cry* promissores na engenharia genética de plantas resistentes aos lepidópteros pragas da cultura do arroz, especialmente às lagartas de *S. frugiperda*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B.; ZUCCHI, R.A.; VENDRAMIN, J.D. **Pragas do milho, arroz, trigo e sorgo**. Curso de Entomologia Aplicado à Agricultura. Piracicaba: FEALQ, 760p., 1992.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J. & DEAN, D.H. **Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal protein**. Microbiological Molecular Biological Review, v.62, p. 807-813, 1998.
- HÖFTE, H. & WHITELEY, H.R. Inseticidal crystal pteoteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.** V.53, p. 242-255, 1989
- LAEMMLI, U.K. **Cleavage os structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature, v. 227, p. 680-685, 1970.
- PINTO, E.G.; RIGHES, A.A.; MARCHEZAN, E. **Rendimento do arroz e manejo da irrigação e da palha de azevém no sistema mix de pré-germinado**. Ciência Rural v.33 n. 2, p. 227-231, 2003
- WEBWR, I.; MARCHEZAN, E.; CARLESSO, R.; MARZARI, V. **Cultivares de arroz irrigado e nutrientes na água de drenagem em diferentes sistemas de cultivo**. Ciência Rural v.33 n.1, p. 27-33, 2003.