

## PATOGENICIDADE DE *BACILLUS THURINGIENSIS THURINGIENSIS* AOS ADULTOS DE *OEBALUS POECILUS* (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

Laura Massochin Nunes Pinto<sup>1</sup>, Juliana da Silva Beringer<sup>1</sup>, José Luís Rosa dos Santos<sup>2</sup>, Jaime Vargas de Oliveira<sup>2</sup> e Lidia Mariana Fiuza<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>PPG em Biologia, Microbiologia, UNISINOS, São Leopoldo, RS. (lauramn@cirrus.unisinos.br) e (fiuza@unisinos.br)  
<sup>2</sup>Estação Experimental do Arroz, IRGA, Cachoeirinha, RS.

Dentre diversos insetos que afetam a produção de arroz no Brasil, destacam-se os percevejos, cuja diversidade abriga espécies benéficas. Os danos devido às infestações do percevejo-do-grão do arroz, *Oebalus poecilus*, resultam em perdas de 1% na produção, sem considerar ainda as possíveis perdas qualitativas (SOSBAI, 2005).

A alimentação dos adultos e ninfas nas espiguetas em formação diminui a produção, reduzindo o rendimento de engenho e o valor comercial do produto. As lesões causadas nas espiguetas, na fase de endurecimento, são responsáveis pela formação de grãos gessados e facilitam a entrada de fitopatógenos (Ferreira *et al.*, 2001).

Até o momento, o controle do percevejo-do-grão tem sido realizado com inseticidas químicos, porém o uso contínuo desses métodos pode provocar o surgimento de pragas resistentes, além da eliminação de inimigos naturais nas áreas de cultivo e possíveis intoxicações de mamíferos (Silva, 1998).

Inicialmente, a avaliação da atividade entomopatogênica das proteínas sintetizadas por *Bacillus thuringiensis*, esteve restrita a lepidópteros, dípteros e coleópteros. Com o isolamento de novas subespécies bacterianas, o seu espectro de ação para diferentes insetos alvo tem sido ampliado e atualmente incluem invertebrados pertencentes a outras ordens, como Hymenoptera (Pinto *et al.*, 2003), além de outros organismos como nematóides, ácaros e protozoários (Feitelson, 1993).

Já foram isoladas centenas de cepas dessa bactéria esporulante, as quais, na sua maioria, produzem inclusões paraesporais com uma ou mais protoxinas inseticidas, denominadas de  $\delta$ -endotoxinas. Cada uma destas protoxinas tem mostrado atividade específica contra as ordens de insetos estudadas (Schnepf *et al.*, 1998). O modo de ação das proteínas, denominadas Cry, tem sido estudado principalmente em lepidópteros e a ação primária destas toxinas é a lise das células epiteliais do intestino médio do inseto alvo, formando nas células intestinais. As inclusões paraesporais ingeridas por larvas suscetíveis dissolvem-se no ambiente alcalino do intestino e as protoxinas solubilizadas são clivadas pelas proteases do intestino médio, originando peptídeos resistentes às proteases que são capazes de se ligarem aos receptores das células intestinais. As proteases que cada grupo de inseto possui são responsáveis pelos diferentes níveis de toxicidade de cada cepa aos diversos insetos (Lightwood *et al.*, 2000; Bravo *et al.*, 2004).

Diversos estudos mostram que os genes *cry* de *B. thuringiensis*, os quais codificam as proteínas Cry, podem ser relacionados com a especificidade tóxica das proteínas às ordens de insetos. Em 1989, Höfte e Whiteley associaram a patogenicidade das proteínas Cry1 aos lepidópteros, Cry2 aos lepidópteros e dípteros, Cry3 aos coleópteros e Cry4 aos dípteros. À medida que novos estudos estão sendo realizados a respeito da atividade de *B. thuringiensis* a diferentes insetos alvo, surgem dados sobre a ação destas famílias de genes *cry* à outras ordens de insetos.

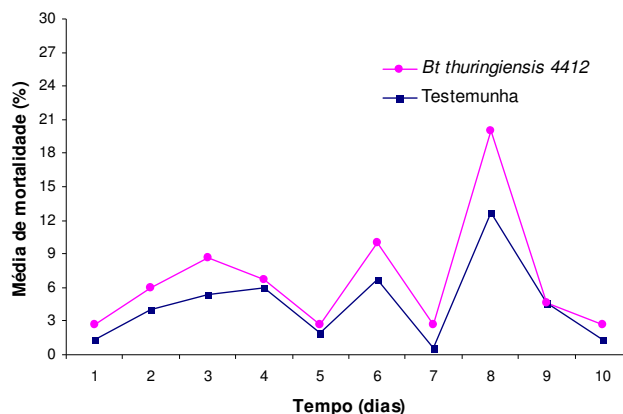
Os biopesticidas à base de *B. thuringiensis* têm sido utilizados no Manejo Integrado de Pragas em áreas agrícolas. Nesse caso, embora diversos trabalhos demonstrem que a presença do esporo bacteriano potencialize a atividade do produto, algumas alternativas têm sido desenvolvidas sem a presença de esporos, como é o caso de plantas geneticamente modificadas expressando o gene *cry* responsável pela síntese da proteína de interesse (Crickmore, 2006).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer em laboratório um método de ensaio *in vivo* contra *O. poecilus* para avaliar a patogenicidade de *B. thuringiensis* contra adultos do percevejo-do-grão do arroz.

Os insetos utilizados nos bioensaios do presente trabalho foram coletados em áreas orizícolas da Depressão Central, no município de Restinga Seca (RS) no ano agrícola 2006/07. No Laboratório de Microbiologia da UNISINOS, os insetos foram acondicionados em gaiolas com plantas de arroz e mantidos em sala climatizada a aproximadamente 25°C, 70% de Umidade Relativa e 12 horas de fotofase.

Neste estudo, foi avaliada a cepa *B. thuringiensis thuringiensis* 4412, a qual foi submetida à pré-cultura de 24 horas e cultura de 72 horas, em meio Usual Glicosado, a 30°C e 180rpm. No preparo das suspensões bacterianas, os esporos foram quantificados em câmara de Neubauer e microscopia óptica, padronizando-se uma concentração de  $1 \times 10^{10}$  células/mL, onde 100µL desta suspensão foi aplicada na superfície de cinco grãos de arroz higienizados e previamente acondicionados em placas de Petri esterilizadas. Após a absorção da suspensão líquida pelos grãos, esses foram infestados com cinco insetos por placa. Os bioensaios foram constituídos de 50 insetos por tratamento e três repetições, totalizando 300 insetos. Na testemunha, a cepa foi substituída por água destilada esterilizada. Os experimentos foram conduzidos em câmara tipo B.O.D., 25±1°C, 70% U.R. e 12h de fotofase. A mortalidade foi avaliada diariamente até o 8º dia após aplicação dos tratamentos (DAT).

Os resultados dos ensaios de patogenicidade de *B. thuringiensis thuringiensis* 4412 aos adultos do percevejo-do-grão encontram-se ilustrados na Figura 1.



**Figura 1.** Mortalidade de adultos de *Oebalus poecilus*, em bioensaios realizados no laboratório, com *B. thuringiensis thuringiensis* 4412, ano agrícola 2006/07.

Este estudo mostra que a cepa *B. thuringiensis thuringiensis* 4412 apresenta patogenicidade contra *O. poecilus*, porém mostra baixa toxicidade, sendo a mortalidade corrigida equivalente a 10% aos 8 DAT. Nesse caso, o efeito letal poderá ser potencializado através da proteína purificada Cry1Ba que é sintetizada pela referida cepa. Os dados sobre a patogenicidade de cepas de *B. thuringiensis* contra hemípteros são restritos, onde se pode destacar a pesquisa realizada no Canadá por Wellman-Desbiens e Cote (2004) com o inseto *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). Neste estudo, os autores avaliaram 117 cepas de *B. thuringiensis* de diferentes subespécies, incluindo a mesma utilizada no presente estudo, a qual causou 100% de mortalidade à espécie alvo.

Embora incipientes os estudos de *B. thuringiensis* aplicados no controle microbiano de hemípteros, esses dados preliminares da patogenicidade de *B. thuringiensis thuringiensis* 4412 contra o pentatomídeo, importante praga da cultura do arroz irrigado,

aliado a outras pesquisas referentes a mesma ordem de insetos, revelam perspectivas à obtenção de plantas resistentes aos ataques e danos diretos ou indiretos de insetos sugadores. Nesse sentido, o entomopatógeno *B. thuringiensis* oferece uma ampla gama de genes *cry* à engenharia genética de plantas.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAVO, A., GOMEZ, I., CONDE, J., MUNOZ-GARAY, C., SANCHEZ, J., MIRANDA, R., ZHUANG, M., GILL, S.S., SOBERON, M. **Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains.** *Biochimica et biophysica acta*. 2004 (1667) 38-46.
- CRICKMORE, N. **Beyond the spore – past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide.** *Journal of Applied Microbiology*. 101. 2006. 616–619p.
- FEITELSON, J.S. **The *Bacillus thuringiensis* family tree**, pp. 63-71. In: L. Kim [ed.], *Advanced engineered pesticides*. Marcel Dekker, New York. 1993.
- FERREIRA, E.; BARRIGOSI, J.A.F.; VIEIRA, N.R.A. **Percevejo das panículas do arroz: fauna heteroptera associada ao arroz.** Circular Técnica On-Line. Embrapa Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás, GO. 08/2001.
- HÖFTE, H. & WHITELEY, H.R. 1989. **Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*.** *Microbiology Reviews*. 53:242-255.
- LIGHTWOOD, D.J., ELLAR, D.J., JARRETT, P. **Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac  $\delta$ -endotoxin.** *Applied Environmental Microbiology*. 66, 2000. 5174–5181.
- PINTO, L.M.N.; AZAMBUJA, A.O.; DIEHL, E.; FIUZA, L.M. **Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from two species of *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae).** *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, 2003. v. 63, n. 2.
- SILVA, R.F.P. **Manejo Integrado de Pragas e Doenças.** In.: *Cultura do Fumo - Manejo Integrado de Pragas e Doenças*. Santa Cruz do Sul, RS. Souza Cruz. 1998. pp.3-8.
- SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D.R. AND DEAN, D.H. ***Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins.** *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 62. 1998. 775-806.
- 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.
- WELLMAN-DESBIENS, E. & COTE J.C. **Screening of the Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains Against *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) Nymphal Population.** *Journal of Economic Entomology* 2004. 97(2): 251-258.