

PERFIL PROTÉICO E PATOGENICIDADE DE *BACILLUS THURINGIENSIS* CEPA T33001 A INSETOS PRAGAS ORIZÍCOLAS

Marcele Pandolfo⁽¹⁾; Jaime Vargas de Oliveira⁽²⁾; José Luis Rosa dos Santos⁽²⁾; Jean-François Charles⁽³⁾; Lidia Mariana Fiuza^(1,2). ⁽¹⁾Microbiologia, UNISINOS, São Leopoldo, RS. ⁽²⁾Estação Experimental do Arroz, IRGA, Cachoeirinha, RS. ⁽³⁾Instituto Pasteur, Paris, FR. (fiuza@unisinos.br).

Palavras-chave: Bactérias entomopatogênicas, *Oryzophagus oryzae*, *Spodoptera frugiperda*.

No manejo integrado de pragas destacam-se as bactérias entomopatogênicas, entre essas, a mais estudada é o *Bacillus thuringiensis*, que é caracterizada pela produção de cristal protéico durante a esporulação e especificidade na ação inseticida, cujas toxinas do cristal são ativas no intestino médio dos insetos susceptíveis (Pinto *et al.*, 2003).

A lagarta *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada importante praga da cultura do arroz irrigado, danificando as folhas das plantas principalmente na fase inicial da cultura (Gallo *et al.*, 2002). O *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) é a principal praga da cultura do arroz irrigado, cuja larva denomina-se bicheira-da-raiz, as quais afetam o desenvolvimento das plantas, danificando o sistema radicular e consequentemente reduzindo a capacidade de absorção de nutrientes (Martins *et al.*, 1996).

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a patogenicidade da cepa T33001 de *Bacillus thuringiensis*, cedida pelo laboratório de *Genie Génétique Bacterienne* do Instituto Pasteur (Paris, França), às larvas de *O. oryzae* e *S. frugiperda*.

Para a realização dos bioensaios a cepa T33001 de *B. thuringiensis* foi crescida em meio usual glicosado durante 48h, a 180 rpm e 28°C. Em seguida, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 5000 rpm, por 15min e o sobrenadante foi descartado. A suspensão bacteriana foi quantificada através da contagem de esporos na câmara de Neubauer e microscópio óptico, posteriormente ajustado na concentração de 1.10^9 céls./mL.

As larvas de *O. oryzae* e as plantas de arroz foram coletadas em áreas experimentais na EEA-IRGA e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da UNISINOS, onde foram efetuados os ensaios biológicos. Os experimentos foram conduzidos utilizando no total 360 larvas (6 repetições), sendo acondicionados em cada tubo de ensaio: 5 larvas, 1 planta de arroz e 8mL de suspensão bacteriana. No tratamento controle a bactéria foi substituída por água destilada e esterilizada. Os ensaios foram acondicionados em B.O.D. a 28°C, 70% U.R. 12h fotofase por 7 dias. Nos bioensaios com *S. frugiperda*, as lagartas utilizadas foram criadas em laboratório. Em cada bioensaio foram utilizadas 100 mini-placas contendo dieta de Poitout & Bues, onde foram individualizadas lagartas de 2º ínstar. Cada tratamento foi constituído de 50 lagartas que receberam 100µL de suspensão bacteriana, a qual foi substituída por água esterilizada no grupo controle. Os experimentos foram acondicionados nas mesmas condições descritas anteriormente. Na análise dos bioensaios com os insetos-alvo, a mortalidade foi corrigida pela fórmula de Abbott (Abbott, 1925).

Na análise do perfil protéico da cepa T33001 de *B. thuringiensis*, essa bactéria foi crescida em Ágar Nutriente, a 30°C, por 48 h e posteriormente a amostra foi desnaturada por 10 min. Em seguida 20µL das amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%, além do marcador de massa molecular (INVITROGEN).

Quanto aos resultados dos ensaios biológicos, os dados correspondentes a mortalidade corrigida das larvas de *O. oryzae* tratadas com a cepa bacteriana mostram que a mesma apresentou uma letalidade média de 29% (Figura 1).

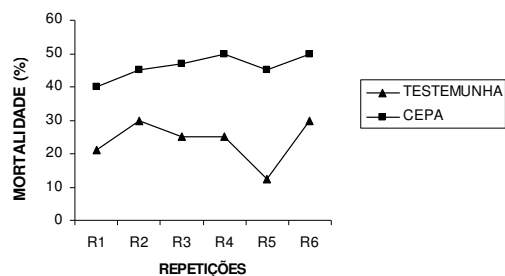


Figura 1. Efeito letal da cepa T33001 de *Bacillus thuringiensis* às larvas de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae).

Os dados referentes à mortalidade corrigida das lagartas de 2ª instar de *S. frugiperda* submetidas aos tratamentos com a cepa T33001 de *B. thuringiensis* encontram-se ilustrados na Figura 2, onde se constata uma reduzida toxicidade da referida cepa bacteriana ao lepidóptero alvo.

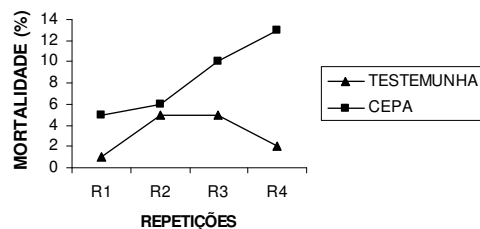


Figura 2. Efeito letal da cepa T33001 de *Bacillus thuringiensis* às lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae).

Os resultados referentes ao perfil protéico da cepa T33001 de *B. thuringiensis*, analisados em SDS-PAGE, encontram-se ilustrados na Figura 3. A referida cepa bacteriana sintetiza proteínas com massa molecular equivalentes a 130 e 70 kDa, onde pode-se inferir que essas correspondem às proteínas Cry ativas contra lepidópteros e coleópteros, respectivamente, conforme descrito nos dados publicados por Crickmore et al. (1998).

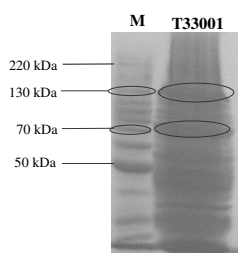


Figura 3. Perfil protéico da cepa T33001 de *Bacillus thuringiensis* em SDS-PAGE a 10%. (M) Marcador de massa molecular da Invitrogen.

Para futura aplicação da cepa T33001 de *B. thuringiensis* no controle da bicheira-da-raiz-do-arroz faz-se necessária a purificação das proteínas Cry sintetizadas e posteriormente avaliação em ensaios biológicos para determinação da Concentração Letal Média (CL50) ao coleóptero alvo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal Economic Entomologic**. N.18, p. 265-267, 1925.
- PINTO, L.M.N.; AZAMBUJA, A.O. de.; OLIVEIRA, J.V. de.; MENEZES, V.G.; FIUZA, L.M. Toxicidade de isolados de *Bacillus thuringiensis* pré-selecionados por PCR, contra *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae). **Anais do Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado**. Vol.2, p.360-362, 2003.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; CARVALHO, R.P.L.; FILHO, E.B.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. In: insetos úteis, Vol.10, p. 219-242, 2002.
- MARTINS, J.F.S. da.; BOTTON, M.; CARBONARI, J.J. Efeito de inseticidas no tratamento de sementes e na água de irrigação no controle de *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima), em arroz irrigado. **Revista Brasileira de Agrociência**. vol.2, no. 1. p. 27-32, 1996.
- 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 Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. N.3, vol.62, p. 807-813, 1998.