

TOXICIDADE DE Cry1Ba, SINTETIZADA POR *BACILLUS THURINGIENSIS* CEPA 4412, À *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Laura Massochin Nunes Pinto¹, Andréa Roveré Franz¹, José Luís Rosa dos Santos², Jaime Vargas de Oliveira² e Lidia Mariana Fiuza^{1,2}. ¹UNISINOS. PPG em Biologia, Microbiologia. São Leopoldo, RS. ²EAA-IRGA, Cachoeirinha, RS. (lauramn@cirrus.unisinos.br)

As lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), denominadas como lagarta-da-folha na cultura do arroz, são consideradas pragas da parte aérea da planta. Estes insetos estão presentes em todos os estados brasileiros, caracterizando-se por terem hábito alimentar polífago, com alto poder de destruição das plantas. Na cultura do arroz irrigado, as lagartas causam os principais danos entre a emergência das plantas e a inundação das lavouras. Os danos nas culturas podem variar desde a redução da população de plantas até a redução da produtividade de grãos.

Na fase inicial da cultura esses insetos têm sido controlados por meio da aplicação de inseticidas piretróides que representam um baixo custo ao produtor, porém com baixa seletividade aos inimigos naturais e conseqüentemente elevado impacto ambiental.

Na linha de controle biológico de insetos da ordem Lepidoptera, destacam-se alguns produtos comerciais à base do entomopatógeno *Bacillus thuringiensis*, os quais mostram-se específicos pela síntese de proteínas Cry (Crickmore, 2006).

A principal característica que confere segurança na utilização de *B. thuringiensis* é sua especificidade aos insetos-alvo. Dentre as 59 famílias de proteínas Cry descritas até o momento (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt), diversos estudos apontam a atividade entomopatogênica das proteínas Cry1 como sendo específica aos insetos da ordem Lepidoptera. As proteínas Cry1 têm peso molecular de aproximadamente 130kDa e apresentam toxicidade a insetos de importância econômica do gênero *Spodoptera* (Höfte & Whiteley, 1989; Luo et al., 1999).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar a toxicidade de *B. thuringiensis* cepa 4412, que sintetiza a proteína Cry1Ba, contra lagartas de 2^o instar de *S. frugiperda*.

Para os ensaios *in vivo*, a bactéria 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. As amostras foram diluídas à concentração de $2,3 \cdot 10^{10}$ células/mL e foram aplicados 100µL na superfície da dieta artificial de Poitout & Bues (1974), preliminarmente acondicionada em mini-placas de acrílico. Na testemunha, a bactéria foi substituída por água destilada esterilizada. Nos ensaios pré-seletivos foram utilizadas 20 lagartas de 2^o instar e três repetições, totalizando 120 insetos. Os experimentos foram conduzidos em condições controladas em câmara tipo B.O.D (25±1°C, 70% U.R. e 12h de fotofase). A mortalidade foi avaliada diariamente até o 7^o dia após aplicação dos tratamentos.

A análise protéica foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS-PAGE). A amostra foi preparada com 15µL da proteína bacteriana purificada, 0,125M Tris-Cl pH6,8, 4% SDS, 20% Glicerol, 10% Mercaptoetanol e 0,1% Azul de Bromofenol. Em seguida, aquecida a 100 °C por 10 min, centrifugada 10.000 rpm por 30s. O SDS-PAGE foi realizado de acordo com o método descrito por Laemmli (1970).

Os dados do perfil protéico de *B. thuringiensis* cepa 4412, apresentados na Figura 1, revelam as bandas contendo a proteína Cry1Ba purificadas com massa molecular de aproximadamente 130 kDa, a qual é ativada pela ação da tripsina presente no intestino médio da lagarta-da-folha, formando peptídeos tóxicos de 65 kDa.

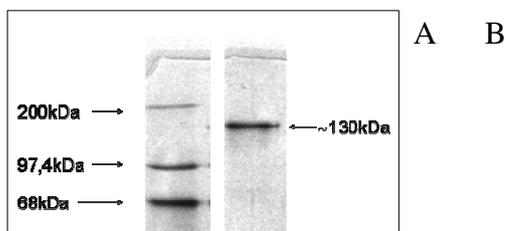


Figura 1. Proteína Cry1Ba purificada de *Bacillus thuringiensis* cepa 4412 (B) em SDS-PAGE (10%) Marcador de peso molecular (A) peptídeo de 130 kDa equivalente a Cry1Ba.

Os resultados da toxicidade *in vivo* de *S. frugiperda* revelaram que o *B. thuringiensis* cepa 4412 apresentou 100% de mortalidade corrigida na concentração de $2,3 \cdot 10^{10}$ células/mL em 48 horas após a aplicação dos tratamentos (Figura 2).

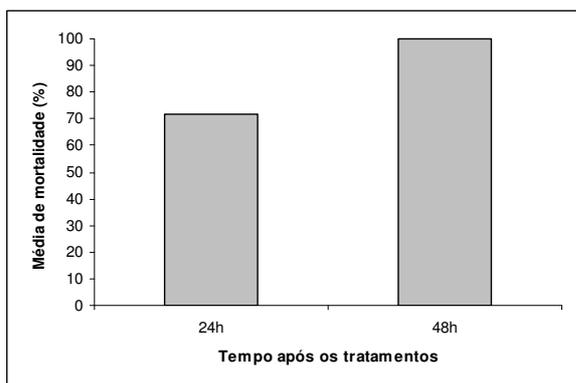


Figura 1. Toxicidade de *B. thuringiensis* cepa 4412 às lagartas de *S. frugiperda*.

Os resultados deste trabalho podem evidenciar o potencial altamente entomopatogênico dessa cepa bacteriana e da proteína Cry1Ba presente no corpo de inclusão paraesporal. Na continuidade dessa pesquisa será determinada a Concentração Letal Média (CL_{50}) tanto da cepa quanto da proteína Cry1Ba purificada à espécie-alvo em estudo, buscando sua aplicação como biopesticida ou fonte de genes de resistência dos cultivares de arroz de interesse comercial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. Standard evaluation system for rice. Manilla INGER/**Genetic Resources Center**, 52p.,1996.
- CRICKMORE, N. Beyond the spore – past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. **Journal of Applied Microbiology**. v.101, p. 616–619, 2006.
- GALLO, Domingos; NAKANO, Octavio; NETO, Sinval S. et al. **Manual de Entomologia Agrícola**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres,1998, 649 p.

HÖFTE, H. E WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Reviews**. 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.

LUO, K., BANKS, D. E ADANG, M.J. Toxicity, Binding, and Permeability Analyses of Four *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ -Endotoxins Using Brush Border Membrane Vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 457-464, 1999.

POITOUT, S., E BUES, R. Elevage des chenilles devingt-huit espèces de Lèpidoptères Noctuidae et de deux espèces d'Arctidae sur milieu artificiel simple. **Annales de Zoologie Ecologie Animale**. v. 6, p. 431-441, 1974.

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, 1998, p. 3-8.