

TOXICIDADE DE ISOLADOS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* PRÉ-SELECIONADOS POR PCR, CONTRA *ORYZOPHAGUS ORYZAE* (COLEOPTERA, CURCULIONIDAE).

Laura Massochin Nunes Pinto ⁽¹⁾, Aline Oliboni de Azambuja ⁽¹⁾, Jaime Vargas de Oliveira ⁽²⁾, Valmir Gaedke. Menezes ⁽²⁾ & Lidia Mariana Fiuza ^(1,2). ¹UNISINOS – Lab. de Microbiologia - São Leopoldo, RS. E-mail: fiuza@bios.unisinos.br; lau@pro.via-rs.com.br ²Instituto Riograndense do Arroz- EEA, Cachoeirinha, RS.

Palavras-chave: bactéria entomopatogênica, inseto- praga, bioensaios, larva, genes *cry*.

Vários trabalhos têm sido realizados visando a diminuição do uso de produtos químicos no controle de insetos-praga, devido aos riscos que estes oferecem ao homem e ao ecossistema. Neste contexto, o controle microbiano ganha destaque como uma alternativa com baixo impacto ambiental, aplicada no Manejo Integrado de Pragas (MIP). A bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), tem sido amplamente estudada por produzir proteínas inseticidas, as quais são codificadas por genes denominados *cry* (Höfte & Whiteley, 1989, Pinto & Fiuza, 2002).

A triagem dos genes *cry* de *Bt* tem sido feita através da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), a qual se aplica na predição da atividade inseticida de novos isolados de *Bt* (Schnepf *et al.*, 1998).

Na região sul do Brasil, a cultura do arroz irrigado tem grande importância econômica, porém vem sofrendo perdas pelo ataque de coleópteros fitófagos. *Oryzophagus oryzae* é considerado o principal inseto prejudicial da ordem Coleoptera, devido ao hábito alimentar rizófago de suas larvas, que torna difícil seu controle. Estes insetos podem ocasionar perdas de produção na ordem de 10 a 30% (Prando, 1999).

A presente pesquisa objetivou selecionar genes *cry* de *Bt* que codificam proteínas ativas para *O. oryzae*, coleóptero prejudicial à cultura do arroz, e testar o potencial tóxico *in vivo* destes isolados para, futuramente, estes serem utilizados no MIP desta cultura.

Nesse estudo, foram utilizados 46 isolados de *Bt* obtidos de amostras de solos coletadas em áreas de cultivo de arroz irrigado do Rio Grande do Sul (RS). Estes isolados pertencem ao banco de bactérias entomopatogênicas do Laboratório de Microbiologia da UNISINOS e ao IRGA (Instituto Rio-grandense do Arroz). O isolado *Bt tenebrionis*, utilizado como controle positivo, foi gentilmente cedidos pelo International Entomopathogenic *Bacillus* Center (Instituto Pasteur, Paris).

Para a PCR, os isolados de *Bt* foram cultivados por 12 horas a 30°C em ágar nutriente e após submetidos a extração total de DNA. Três pares de *primers* universais foram sintetizados nesse estudo: *cry3*, *cry7/8* e *cry8* (Ben-Dov *et al.*, 1997, Bravo *et al.*, 1998). Estes *primers* identificam genes que codificam proteínas tóxicas específicas à coleópteros. Cada reação de PCR foi realizada com volume final de 25µL, sendo: 1µL de amostra de DNA com o tampão de reação, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 a 0,5 µM de cada *primer* e 0,5U de *Taq* DNA polimerase (GIBCO-BRL). A amplificação foi realizada em termociclador regulado para 35 ciclos de reação cada, onde as amostras foram desnaturadas 1 min a 94° C, aneladas aos *primers* por 40-50s a 60° C e a extensão dos produtos da PCR foi realizada por 50-90s a 72° C. Reações sem adição de DNA foram utilizadas como controle negativo. Os fragmentos amplificados foram analisados em géis de agarose a 1 e 1,5%.

As larvas de *O. oryzae* utilizadas nos bioensaios foram coletadas das raízes das plantas de arroz na EEA-IRGA (Cachoeirinha, RS), aproximadamente quatro horas antes da realização dos bioensaios. Para a avaliação dos isolados que revelaram a presença de genes *cry3* ou *cry7* por PCR, cada suspensão bacteriana, na concentração de 8.10^{10} céls/mL, foi adicionada em tubos de ensaio com duas plantas de arroz e 8 mL de água do arrozal. O grupo controle não teve adição de suspensão bacteriana. A mortalidade foi

avaliada no 7º dia para todos os tratamentos. O total de vinte larvas de 3º e 4º instares foram avaliadas para cada tratamento.

A análise dos produtos amplificados a partir dos isolados revelou a presença de fragmentos característicos de genes *cry*. A partir da análise do tamanho dos produtos amplificados por PCR, foram identificados os genes *cry3* (285 a 769pb) e *cry7* (285 a 769pb) (Ben-Dov *et al.*, 1997). Os genes *cry8* não foram amplificados nas amostras analisadas (Tabela 1).

Tabela 1. Características de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidos de áreas de arroz irrigado do Rio Grande do Sul e sua toxicidade contra *Oryzophagus oryzae*. UNISINOS/IRGA, 2002.

Isolados de <i>B. thuringiensis</i>	Genes detectados			Mortalidade Corrigida (%)
	<i>cry3</i>	<i>cry7</i>	<i>cry8</i>	
1608-7	+	-	-	67,7
2017-9	+	-	-	100
1610-6	+	-	-	100
3280-1	+	-	-	59,6
1489-3	-	+	-	59,6
2014-2	+	-	-	53,4

(+) presença do gene; (-) ausência do gene.

Nos bioensaios com *O. oryzae*, utilizando os seis isolados de *Bt* selecionados por PCR, a mortalidade foi corrigida de acordo com a fórmula de Abbott, sete dias após a aplicação dos tratamentos. Os isolados *Bt* 2017-9 e *Bt* 1610-6 atingiram 100% de mortalidade às larvas desses insetos (Tabela 1). Estes resultados revelam pela primeira vez a patogenicidade de isolados de *Bt* à larvas de *O. oryzae*.

A grande diversidade de genes *cry* de *Bt* e o amplo espectro de ação de suas toxinas inseticidas têm estimulado muitos grupos de pesquisa a isolar cepas nativas de *Bt* mundialmente). No presente estudo, foram obtidos isolados de *Bt* em todas as áreas produtoras de arroz irrigado do Rio Grande do Sul, sendo que os seis isolados selecionados por PCR neste trabalho mostraram-se amplamente distribuídos neste estado (Figura 1).

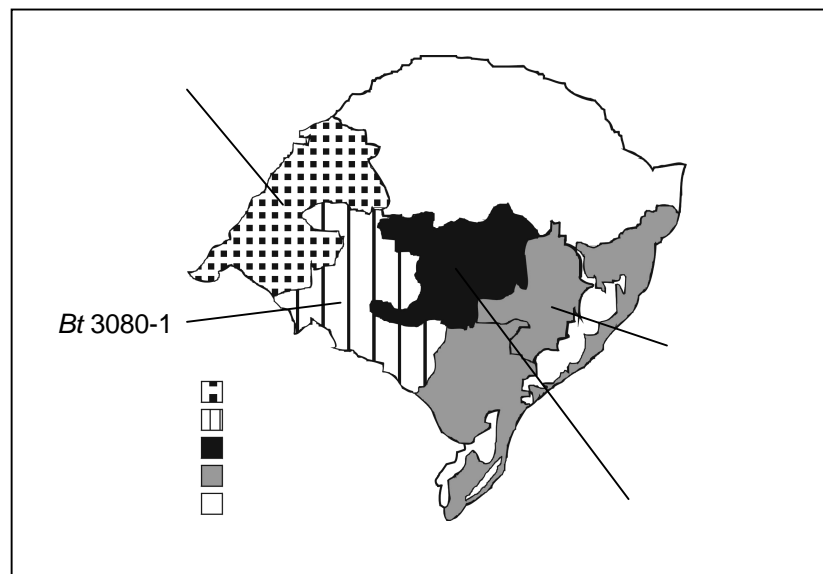


Figura 1. Regiões orizícolas do Rio Grande do Sul; (FO) Fronteira Oeste; (CA) Campanha; (DC) Depressão Central; (LI) Litoral; (NO) área Não Orizícolas. UNISINOS/IRGA, 2002.

A análise *in vitro*, através da detecção molecular dos genes *cry* presentes nos isolados, a qual precede os testes *in vivo* com insetos, têm sido avaliada como uma estratégia rápida e eficaz na seleção de isolados de *Bt* a serem testados. Os bioensaios com *O. oryzae* mostraram resultados altamente satisfatórios considerando que não existem trabalhos realizados com este entomopatógeno contra o inseto-alvo. Os resultados dos bioensaios realizados confirmaram a predição da atividade inseticida de *Bt* através da PCR, possivelmente devido à presença dos genes *cry3* e *cry7*, os quais codificam toxinas específicas a coleópteros (Ben-Dov *et al.*, 1997).

Novos bioensaios contra *O. oryzae* serão realizados com outros isolados do banco de bactérias entomopatogênicas do laboratório, os quais foram positivos em PCR para os genes testados, mas não foram testados *in vivo* ainda devido à dificuldade da realização dos bioensaios, visto que esta espécie de inseto ainda não tem método para criação em laboratório e os testes somente podem ser realizados durante o cultivo do arroz irrigado.

A seleção de genes *cry* realizada neste trabalho identificou novos isolados de *Bt*, os quais poderão ser avaliados em campos experimentais e futuramente utilizados na formulação de um biopesticida. Os genes *cry* identificados poderão ser utilizados na obtenção de plantas resistentes a larvas de *O. oryzae*, através da engenharia genética. Ambos os métodos podem ser aplicados no Manejo Integrado de Pragas da cultura do arroz irrigado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABBOTT, W.S. **A method of computing the effectiveness insecticide.** *Journal of Economic Entomology*, College Park, 18:265-267, 1925.
- BEN-DOV, E.; ZARITSKI, A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAI, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TROITSKAYA, E.; DUBITSKY, A.; BEREZINA, N.; MARGALITH, Y. **Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:4883-4890, 1997.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M.; Soberón, M.; Quintero, R. **Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:4965-4972, 1998.
- HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. **Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*.** *Microbiol. Rev.*, 53:242-255, 1989.
- PINTO, L.M.N.; FIUZA, L.M. **Genes *cry* de *Bacillus thuringiensis*: uma alternativa biotecnológica aplicada ao manejo de insetos.** *Biociências*, 10(2):3-13, 2002.
- PRANDO, H. F. **Aspectos bioecológicos e de controle de *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima,1936) (Coleoptera, Curculionidae) em arroz irrigado, sistema de cultivo pré-germinado.** Curitiba, 1999, 100p. (Ph.D. Thesis. PPGCB. UFPR)
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VANRIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. ***Bacillus thuringiensis* and its Pesticidal Crystal Proteins.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62:775-806, 1998.