

# AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) PARA *Diatraea saccharalis* (LEP.: CRAMBIDAE)

E.D. Grecco<sup>1</sup>, F.S. Machado<sup>2</sup>, A.M. Fracalossi<sup>3</sup>, R.S.Minas<sup>4</sup>, R.A. Polanczyk<sup>5</sup>,  
D. Pratissoli<sup>6</sup>

<sup>1</sup>UFES/ Departamento de Fitotecnia, [grecco.eduardo@bol.com](mailto:grecco.eduardo@bol.com)

<sup>2</sup>UFES/ Departamento de Fitotecnia, [flavioengagro@hotmail.com](mailto:flavioengagro@hotmail.com)

<sup>3</sup>UFES/ Departamento de Fitotecnia, [arildomf@hotmail.com](mailto:arildomf@hotmail.com)

<sup>4</sup>UFES/ Departamento de Fitotecnia, [ramonsm7@hotmail.com](mailto:ramonsm7@hotmail.com)

<sup>5</sup>UFES/ Departamento de Fitotecnia, [ricardo@cca.ufes.br](mailto:ricardo@cca.ufes.br)

<sup>6</sup>UFES/ Departamento de Fitotecnia, [dirceu@npd.ufes.br](mailto:dirceu@npd.ufes.br)

**Resumo:** Este trabalho objetivou selecionar isolados da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* patogênicos para a broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) visando fornecer subsídios para a transformação de plantas expressando genes deste microrganismo. Os isolados Bt-11, Bt-13, Bt-23, Bt-27 e Bt-28 proporcionaram melhores resultados causando 100% de mortalidade em lagartas de segundo instar.

**Palavras-chave:** Entomopatógeno, Controle biológico, Broca-da-cana, Cana-de-açúcar, Transgenia.

**Área do Conhecimento:** I - Ciências Exatas e da Terra

## INTRODUÇÃO

A Broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) é uma das principais pragas da cana-de-açúcar, ocorrendo em todas as regiões açucareiras do Brasil (Carvalho et al., 2002). O adulto da broca, a mariposa, ovoposita preferencialmente na parte dorsal das folhas. As lagartas recém eclodidas dos ovos se alimentam da folha e no 2º instar penetram no colmo abrindo galerias (Parra, 1993). Além dos prejuízos diretos causados pela broca como perda de peso, morte das gemas e aberturas de galerias nos colmos, a referida praga causa prejuízos indiretos ainda mais significativos devido a penetração de microorganismos causadores de podridões, que invertem a sacarose e produzem metabólitos inibidores, diminuindo a pureza do caldo e, conseqüentemente, reduzindo o rendimento industrial para a produção de açúcar (Gallo et al., 2002).

Devido à biologia da praga, o controle químico da broca-da-cana se torna inviável já que essa passa a maior parte de sua fase larval dentro do colmo, ficando inacessível ao contato com inseticidas, além de ser oneroso devido ao porte da cultura (Gallo, 2002). Por essa razão surgiu o interesse na transferência de genes de resistência para minimizar os danos causados por essa praga (Braga et al., 2003).

Plantas transgênicas resistentes a insetos, desenvolvidas pela integração, nos seus genomas, dos genes de resistência provenientes desses microrganismos, constituem-se em mais uma alternativa com grande potencial de proteção

contra as perdas causadas por insetos-praga (SCHULER et al., 1998; HILDER & BOULTER, 1999; BETZ et al., 2000).

Com a clonagem e a caracterização de um gene de *Bt* codificador de uma proteína responsável pela atividade tóxica a insetos em 1981 (SCHNEPF & WHITELEY, 1981), novas perspectivas do uso desta bactéria e de suas

proteínas inseticidas foram vislumbradas. Entre elas, está a possibilidade de se introduzir os genes de *Bt* codificadores das toxinas nos genomas da cana-de-açúcar, permitindo a expressão contínua das proteínas em todos os tecidos da planta e atingindo, assim, apenas os insetos-praga que se alimentam dos tecidos (De MAAGD et al., 1999). A primeira geração de plantas transgênicas resistentes a insetos foi desenvolvida exatamente com o uso de genes codificadores de proteínas inseticidas do entomopatógeno *Bt* (FISCHHOFF, 1987; VAECK et al., 1987).

A busca de linhagens de *Bt* com alta atividade tóxica e diferentes especificidades a insetos é de extrema importância tanto para a produção de novos biopesticidas como para a utilização destas linhagens como fonte de genes para a obtenção de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos (BOBROWSKI et al., 2001).

O objetivo desse trabalho foi de selecionar isolados de *Bt* patogênicos para a broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*), que poderão contribuir, no futuro, para a transformação de plantas de cana-de-açúcar contendo genes de *B. thuringiensis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de *Bacillus thuringiensis* foram cultivadas em meio Usual, com 5g de levedura, 10g peptona, 5g cloreto de sódio, 20g de açúcar para 1 litro de água destilada, que deverá ser esterilizado por 30 minutos em autoclave à pressão de 1,5 Kgf/cm<sup>2</sup>. As placas de Petri foram esterilizadas em estufas por 2h à uma temperatura de 120°C. Após a esterilização do meio de cultura, o mesmo deve ser incubado nas placas de Petri, onde permaneceram sobre a Câmara de Fluxo para que as mesmas voltassem a temperatura ambiente. A bactéria foi repicada à placa através de uma alça de platina esterilizada com álcool e fogo que são transferidas para tubos de Falcon (50mL) com 20 mL de água destilada, esterilizada em autoclave. Estes tubos serão centrifugados por 30 minutos onde se retira a cada centrifugação o material suspenso e adiciona-se novamente 20 ml de água destilada. Esta operação foi repetida por três vezes, adicionado por último 10 mL de água destilada.

*Diatraea saccharalis* foi criada em laboratório com dieta artificial elaborada por Hensley & Hammond (1968), modificada, usada para criação de lagartas de *D. saccharalis*. Os adultos permaneceram em câmara de postura feita de tubos de PVC ( $\pm$  15 cm de diâmetro X 20cm de altura). Após a postura recolheram-se os ovos, e foram transferidos para uma câmara climatizada ( $\pm$  25°C) e fotofase ( $\pm$  12 h). Após a eclosão das lagartas, estas foram inoculadas em tubos de ensaio (10cm x 2.5cm) contendo dieta, devidamente esterilizados em estufa e germicida. Os estágios, lagarta e pré-pupa permaneceram na dieta em sala climatizada ( $\pm$  25°C) e fotofase ( $\pm$  12 h). Ao atingir o estágio de pupa, estas foram transferidas para as câmaras de postura.

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Entomologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo. O delineamento foi inteiramente casualizado, com 7 tratamentos e 5 repetições, contendo 10 lagartas de segundo instar do inseto em gerbox (2,0 X 6,0 cm) com a dieta. Para a testemunha utilizou-se água destilada. Os tratamentos foram avaliados após 48 h da inoculação, sendo feitas avaliações diárias durante sete dias. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%, pelo Sistema de Análise Estatística (SANEST).

## RESULTADOS

Tabela 1: percentual de mortalidade de *Diatraea saccharalis* (LEP.: CRAMBIDAE) por diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis* após sete dias de avaliação.

Isolados	Mortalidade %
Bt 11	100,00 A
Bt 13	78,00 A
Bt 17	42,00 B
Bt 23	100,00 A
Bt 27	100,00 A
Bt 28	100,00 A
Testemunha (água destilada)	8,00 C

CV = 19,14 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% pelo Teste de Tukey.

## DISCUSSÃO

Observou-se que os isolados de *Bt* Bt-11, Bt-13, Bt-23, Bt-27 e Bt-28, mostraram-se promissores para o controle de *D. saccharalis*. O isolado E-17, não foi tão eficiente para o controle. Todos os isolados de *Bt* foram significativos em relação a testemunha. Estudos posteriores serão desenvolvidos para a estimativa da CL<sub>50</sub>, gerando informações sobre a virulência deste isolados pré-selecionados. Desta forma, serão obtidas informações mais sólidas sobre o potencial das toxinas de *Bt* no controle da broca da cana.

## CONCLUSÃO

Os isolados de *Bt* Bt-11, Bt-13, Bt-23, Bt-27 e Bt-28 são mais indicados para o controle da broca-da-cana.

## REFERÊNCIAS

- [1] CARVALHO, S.S.A.; AMORIN, S.C.R.; LIMA, I.S. Comportamento reprodutivo da broca da cana-de-açúcar *Diatrea saccharalis* L. (Lepidoptera, Crambidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 19., Manaus, 2002. **Resumos**. Piracicaba: Sociedade Entomologica do Brasil, 2002. p.18.
- [2] PARRA, J.R.P. Controle das principais pragas da cana-de-açúcar. In: CÂMARA, G.M.S.; OLIVEIRA, E.M.A. de (Ed.). **Produção de cana de açúcar**. Piracicaba: FEALQ, 1993. p.184-197.
- [3] GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.B.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Manual de Entomologia Agrícola**. 10. ed. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.
- [4] BRAGA, D.P.V.; ARRIGONI, E.D.B.; SILVA-FILHO, M.C.; ULIAN, E.C.; Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatrea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds**, 2003. /No prelo/
- [5] SCHULER, T.H. et al. Insect-resistant transgenic plants. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.16, p.168-174.1998.
- [6] HILDER, V.A.; BOULTER, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance - a critical review. **Crop Protection**, Oxford, v.18, p.177-191, 1999.
- [7] BETZ, F.S.; HAMMOND, B.G.; FUCHS, R.L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. **Regulatory, Toxicology and Pharmacology**, San Diego, v.32, p.156-173, 2000.
- [8] SCHNEPF, E.; WHITELEY, H.R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.78, p.2893-2897, 1981.
- [9] De MAAGD, R.A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Sciences**, London, v.4, p.9-13, 1999.
- [10] FISCHHOFF, D.A. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Bio/technology**, London, v.5, p.807-813, 1987.
- [11] VAECK, M. et al. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, New York, v.327, p.33-37, 1987.
- [12] BOBROWSKI, V.L. et al. Detection of *cry1* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from south of Brazil and activity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, p.105-109, 2001.
- [13] HENSLEY, S.D. & A.M. HAMMOND JR. 1968. **Laboratory technique for rearing the the sugarcane borer on an artificial diet**. *J.Econ.Entomol.* 61: 1742-1743.

