

Perotoni, G.<sup>1</sup>, Silva, W.O.B.<sup>2</sup>, Santi, L.<sup>2</sup>, Broetto, L.<sup>2</sup>, Carlini, C.<sup>1,3</sup>, Vainstein, M.H.<sup>1,2</sup>, Schrank, A.<sup>1,2</sup>

1- Centro de Biotecnologia, UFRGS; 2- PPGBCM, CBIOT, UFRGS; 3- Departamento de Biofísica, UFRGS.

## INTRODUÇÃO

*Dysdercus peruvianus* é um inseto-praga da cultura de algodão causador de grandes perdas econômicas. Atualmente, o controle desta e da maioria das pragas da cadeia agropecuária baseia-se no uso de inseticidas, prática cada vez mais questionada por seu impacto econômico e ambiental. Neste contexto, o controle biológico surge como uma alternativa viável e cada vez mais promissora. Porém, um dos grandes entraves em relação ao uso de agentes biocontroladores é o tempo de morte do hospedeiro ser, muitas vezes, maior que seu correspondente químico. O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é um biocontrolador utilizado mundialmente no controle de diversas pragas e comprovadamente um potencial biocontrolador de *D. peruvianus*.



Figura 1: Ninfa de 4º. instar e adulto de *D. peruvianus*.

## OBJETIVO

Isolar e selecionar bactérias ambientais para o controle biológico de *D. peruvianus* associado ao fungo *M. anisopliae*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Isolamento e seleção de bactérias:** Para o processo de isolamento das bactérias, indivíduos adultos de *D. peruvianus*, imersos ou não em suspensão de esporos de *M. anisopliae*, foram expostos ao ambiente por 30 dias em diferentes locais e solos nas proximidades do Centro de Biotecnologia da UFRGS, no Campus do Vale, Porto Alegre, RS. Após esse período, 8 (oito) bactérias (codificadas como: 1A, 2AA, 7B, 10A, 10B, 10Cont, 627AA e 627B) foram isoladas e selecionadas utilizando-se meio mínimo adicionado de 1% de quitina.

**Identificação molecular das bactérias:** As bactérias foram submetidas a identificação através do seqüenciamento de um fragmento do gene 23S e do gene 16S rRNA. A amplificação por PCR (30 ciclos de 5min a 94°C, 45s a 94°C, 1min a 60°C e 1min a 72°C) com os oligonucleotídeos MS37 e MS38 para 23S e R1492, F27, R1087, F945, R518 e F357 para 16S rRNA. Os produtos de PCR, de aproximadamente 850pb, foram purificados com o kit GFX (GE) e seqüenciados com o kit *Dyanamic ET Dye Terminator cycle* no sistema de análise MegaBace (GE). O programa Staden Package foi utilizado a construção da seqüência consenso. Estas seqüências foram comparadas com o banco de dados do NCBI usando o programa BLAST.

**Bioensaios:** Bioensaios foram realizados utilizando diferentes tratamentos: suspensão de esporos de *M. anisopliae* (met), met+cultura líquida do isolado selecionado, met+células bacterianas lavadas e met+sobrenadante de cultura dos isolados bacterianos. Além disso, testes somente com culturas bacterianas, células lavadas e sobrenadantes bacterianos avaliados. Para tal, 10 insetos por frasco (n=30) foram divididos em grupos, desinfetados e imersos por 30 segundos nos diferentes tratamentos. Os insetos foram mantidos com água e alimento a 28°C e fotoperíodo 16:8 (claro/escuro).

**Análise estatística:** O cálculo de tempo letal (LT<sub>50</sub>) dos bioensaios foi realizado utilizando a análise de Probit através do programa SPSS 10.0 for Windows.

## RESULTADOS

Tabela 1: Identificação dos isolados bacterianos pela comparação das seqüências do gene 23S rRNA comparadas com o banco de dados do NCBI.

ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO	IDENTIDADE %
1 A	<i>Alcaligenes faecalis</i>	97%
627 AA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	97%
10 B	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	96%
2 AA	<i>P. fluorescens</i>	98%
10 A	<i>Bacillus cereus</i>	97%
10 Cont	<i>Enterococcus flavescens</i>	97%
7 B	ND	
627 B	ND	

Tabela 2: Identificação dos isolados bacterianos pela comparação das seqüências do gene 16S rRNA comparadas com o banco de dados do NCBI.

ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO	IDENTIDADE %
627 AA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99%
2 AA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99%

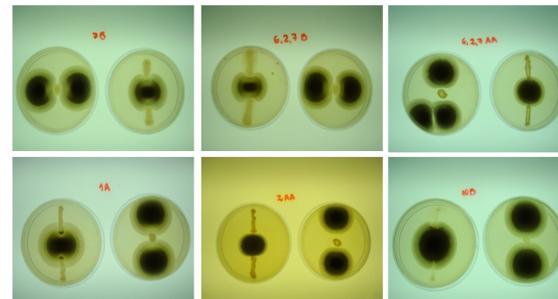


Figura 2: Confrontos em meio BDA entre *M. Anisopliae* e os diferentes isolados bacterianos.

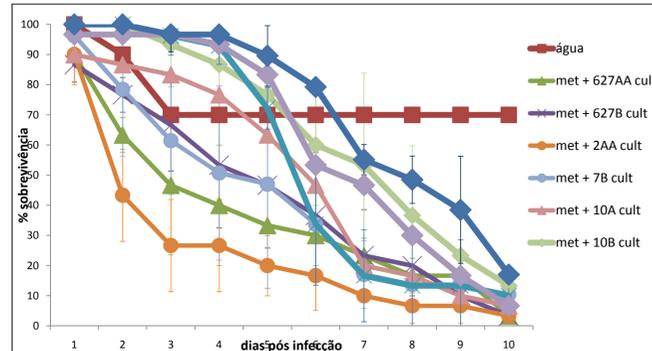


Figura 3: Curva de sobrevivência de *D. peruvianus* infectado com *M. anisopliae* e *M. anisopliae* associado com diferentes isolados bacterianos.

Tabela 2: Tempo letal (LT<sub>50</sub>) dos bioensaios utilizando diferentes isolados bacterianos associados a *M. anisopliae*.

ISOLADO	LT <sub>50</sub>
1 A	6,04 (5,50 – 6,57)
627 AA	3,74 (3,0 – 4,34)
10 B	7,04 (6,52 – 7,61)
2 AA	2,33 (1,18 – 3,12)
10 A	5,48 (4,89 – 6,07)
10 Cont	6,73 (6,31 – 7,18)
7 B	4,63 (3,88 – 5,30)
627 B	4,59 (4,06 – 5,08)
<i>M. anisopliae</i>	7,54 (6,21 – 9,85)

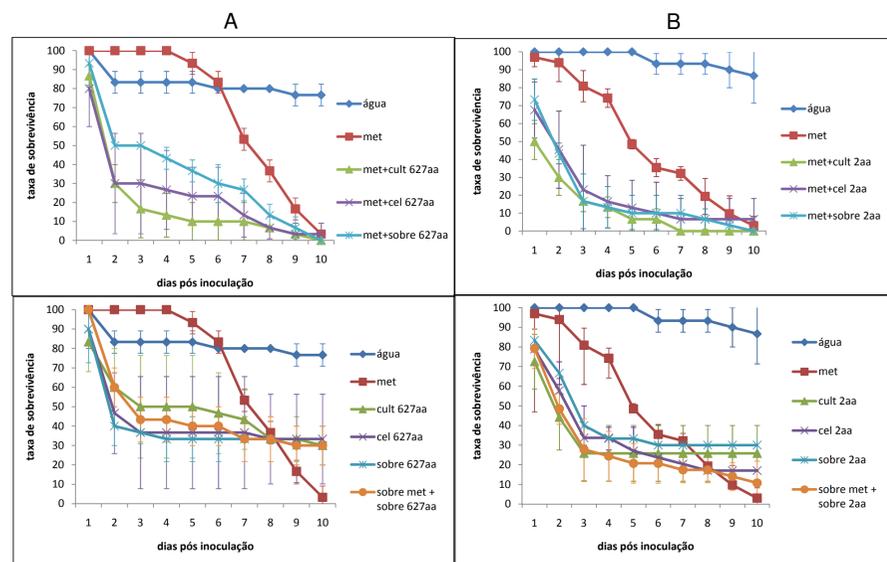


Figura 6: Curva de sobrevivência de *D. peruvianus* infectado com *M. anisopliae*, *M. anisopliae* associado aos isolados bacterianos 627AA (A) e 2AA (B) (diferenciado em cultura total, células lavadas e sobrenadantes) e somente cultura total, células lavadas e sobrenadantes do isolado.

## CONCLUSÃO

Os isolados 7B, 627B (não determinados), 2AA e 627AA (*Pseudomonas fluorescens*), efetivamente diminuem o tempo de morte de *D. peruvianus* quando associados com *M. anisopliae*.

## PERSPECTIVAS

- Realizar bioensaios em outros artrópodes-praga e vetores de doenças como, o barbeiro (*Rhodnius prolixus*), o carrapato bovino (*Rhipicephalus microplus*) e o mosquito transmissor da dengue (*Aedes aegypti*).