

COLONIZAÇÃO DE ARROZ E DE LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda* POR BACTÉRIA ENDOFÍTICA GENETICAMENTE MODIFICADA

Fátima T. Rampelotti¹; Anderson Ferreira²; Paulo T. Lacava²; José Djair Vendramim¹; Wellington L. Araújo²; João Lúcio de Azevedo². ¹Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP, Av. Pádua Dias, 11, 13418-900. (ftrampelotti@hotmail.com). ²Departamento de Genética, ESALQ/USP, Av. Pádua Dias, 11 - Caixa Postal 83, 13400-970, Piracicaba, SP.

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta-do-cartucho, é originária das zonas tropicais e subtropicais do continente americano. Devido a sua alta polifagia apresenta grande importância econômica para diferentes culturas tais como arroz (*Oryza sativa* L.), milho (*Zea mays* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.), entre outras (Arthur *et al.*, 2002). Esse inseto danifica a cultura do arroz por se alimentar de plantas jovens antes da inundação definitiva, sendo mais importante para o sistema de arroz irrigado convencional (Busato *et al.*, 2004). O controle dessa lagarta é realizado basicamente pela utilização de inseticidas químicos, sendo, portanto, necessários novos estudos para viabilizar estratégias dentro das propostas do manejo integrado de pragas (MIP) nas diferentes culturas, para suprimir as populações infestantes.

Os avanços biotecnológicos têm permitido identificar microrganismos endofíticos promissores no controle biológico de insetos-praga (Azevedo *et al.*, 2000). Microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior das plantas sem causar qualquer efeito negativo aparente (Hallmann *et al.*, 1997). Azevedo & Araújo (2007) definiram endófitos como todos os microrganismos que habitam o interior da planta hospedeira, sem causar danos aparentes ou estruturas externas visíveis, excluindo desta maneira microrganismos que fixam nitrogênio atmosférico e produzem nódulos nas raízes vegetais, como também os fungos micorrízicos, ambos conceitualmente endofíticos, mas que apresentam características próprias e são bem mais estudados que os endofíticos que habitam partes aéreas de plantas. A presença desses microrganismos pode conferir proteção, resistência a insetos, melhoria no desenvolvimento, entre outros benefícios (Azevedo *et al.*, 2000; Araújo *et al.*, 2002; Scherwinski *et al.*, 2007). Além da ocorrência natural de endófitos nas plantas, muitos estudos estão sendo realizados com microrganismos geneticamente modificados (MGM) com intuito de avaliar a forma de colonização do hospedeiro usando microscopia de fluorescência (Lacava *et al.*, 2007). Essa forma de colonização das plantas pode possibilitar o uso desses MGMs para conferir resistência aos insetos, visto que o microrganismo poderia ser transformado com gene(s) responsável pela morte do inseto alvo.

Dentro desse contexto, esse trabalho teve o objetivo de avaliar a colonização de uma bactéria endofítica geneticamente modificada em plântulas de arroz e em lagartas de *S. frugiperda*, sendo realizados os seguintes experimentos:

(i) Colonização de arroz por *Methylobacterium mesophilicum* geneticamente modificada. Utilizou-se a bactéria endofítica *M. mesophilicum* transformada geneticamente com um plasmídeo contendo o gene repórter da GFP (*Green Fluorescent Protein*) e um gene marcador conferindo resistência ao antibiótico tetraciclina. Sementes da cultivar de arroz Epagri 112 foram germinadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog) a 26°C com 12 h de fotoperíodo. Sete dias após a germinação, as plântulas foram retiradas do meio de cultura e suas raízes foram submersas em uma suspensão de células bacterianas na concentração de 10^8 células ml^{-1} , por uma hora. Após o contato com as bactérias, as plântulas foram transplantadas para frascos contendo o meio MS e mantidas nas mesmas condições fototérmicas da germinação. Aos cinco e dez dias após a inoculação, foram realizados isolamentos de *M. mesophilicum* da parte aérea das plântulas de arroz, utilizando 1 g de tecido, o qual foi submetido à desinfestação superficial (1 min em álcool 70%; 2 min em hipoclorito de sódio 2,5%; e lavagens em água destilada autoclavada), sendo macerado em 5 ml de tampão PBS (tampão fosfato). Aliquotas foram plaqueadas

em meio de cultura contendo o antibiótico tetraciclina ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$). A condição de incubação foi de 30°C por sete dias. Após a incubação, o número total de unidades formadoras de colônia (UFC) foi avaliado. Paralelamente, cortes *in natura* das plântulas de arroz inoculadas foram analisadas, quanto à colonização, por microscopia de fluorescência.

(ii) Interação de *M. mesophilicum* com *S. frugiperda*. Utilizou-se a mesma bactéria endofítica do experimento anterior. Lagartas de *S. frugiperda* de 3^o ínstar, mantidas em criação de laboratório sob dieta artificial (Parra, 2001), foram utilizadas para condução do bioensaio, que constou de dois tratamentos, com e sem *M. mesophilicum*. Nos tubos contendo a bactéria esta foi inoculada por meio da aspersão de $50 \mu\text{L}$ de suspensão bacteriana (10^8 ml^{-1}). Transferiu-se uma lagarta para cada tubo mantendo-os em condições laboratoriais ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e com 12h de fotoperíodo).

As avaliações para detectar a presença da bactéria no trato digestivo da lagarta foram realizadas as 24, 48 e 96 h após a instalação do bioensaio. Para este procedimento, cinco lagartas de cada tratamento foram submetidas a um processo de assepsia (30 s em álcool 70%; 30 s hipoclorito de sódio 2,5%; 30 s em álcool 70%; e duas lavagens em água destilada autoclavada), sendo separadas a cabeça e o restante do corpo. O corpo de cada lagarta e as cabeças de cada tratamento foram macerados em PBS (proporção 1 g tecido para 10 ml de PBS), sendo plaqueados $100 \mu\text{l}$ do macerado por placa de meio de cultura. A condição de incubação foi de 30°C por 7 dias. A fim de se observar a presença da bactéria após a passagem pelo trato digestivo da lagarta, fez-se a diluição das fezes em PBS e plaqueamento como nos procedimentos anteriores. Para cada época de reisolamento de bactérias, foram analisadas cinco lagartas utilizando três repetições para cada inseto.

No experimento (i), onde se avaliou o número de UFC bacterianas isoladas das plântulas de arroz inoculadas com *M. mesophilicum*, expressando GFP, observou-se a colonização da parte aérea do arroz aos cinco e dez dias após a inoculação. Essa colonização foi constatada tanto nos ensaios de reisolamento em meio de cultura quanto nas análises de cortes *in natura* em microscópio de fluorescência. O número médio de UFC obtidas aos cinco e dez dias após a inoculação foi de 5×10^1 e $8,2 \times 10^1 \text{ UFC.g}^{-1}$ de tecido respectivamente.

No experimento (ii), onde se avaliou o número de UFC bacterianas isoladas de *S. frugiperda*, observou-se a presença de *M. mesophilicum* nas amostras do trato intestinal e da cabeça das lagartas avaliadas somente após 96 horas. O número médio de UFC obtidas do trato intestinal e cabeça foi de 8×10^2 e $2 \times 10^2 \text{ UFC.g}^{-1}$ de tecido, respectivamente. Não se observou UFC nos reisolamentos realizados a partir das fezes das lagartas, para todas as épocas avaliadas.

M. mesophilicum expressando um gene marcador foi capaz de colonizar plântulas de arroz e sobreviver no trato intestinal das lagartas. No presente trabalho, o gene inserido na bactéria era responsável pela produção da proteína GFP, a qual não é tóxica ao inseto. No entanto, se genes responsáveis pela produção de uma proteína tóxica ao inseto forem inseridos, esse microrganismo endofítico pode se tornar um candidato no controle de *S. frugiperda*. As plântulas inoculadas com a bactéria passariam a ser resistentes ao inseto por antibiose.

Como a presença da bactéria nas lagartas foi observada somente 96 h após a inoculação algumas hipóteses podem ser consideradas. Uma delas é a possibilidade de o isolamento ter sido realizado antes de a bactéria ter sofrido ação das enzimas gástricas do inseto, mas nesse caso é preciso considerar as avaliações anteriores (24 e 48 h), pois o mesmo poderia ter acontecido. Cabe ainda ressaltar que a quantidade de alimento ingerido pelas lagartas foi maior que o ingerido no início do bioensaio onde elas lagartas eram menores, devendo-se assim considerar o fator de diluição do material durante o reisolamento. Outra hipótese estaria relacionada ao período que a bactéria levaria para colonizar o interior do inseto.

Dessa forma, estudos mais aprofundados sobre os mecanismos envolvidos na interação entre inseto, bactéria e planta são necessários para que se possa definir melhor uma estratégia de controle. A estimativa da frequência inicial e a possibilidade de

crescimento dessa bactéria no interior do trato digestivo do inseto podem se constituir em ferramenta importante para engenheirar um microrganismo capaz de expressar genes de interesse no controle endossimbiótico de *S. frugiperda*.

Apoio financeiro: CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, J.; ELSAS, J.D.V.; VUURDE, J.W.L.V.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 68, p. 4906–4914, 2002.
- ARTHUR, V.; AGUILAR, J.A.D.; ARTHUR, P.B. Esterilização de adultos de *Spodoptera frugiperda* a partir de pupas irradiadas. **Arquivos do Instituto Biológico**, vol. 69, n. 2, p. 75-77, 2002.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr., W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. de. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 3, p. 40-65, 2000.
- AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Fungi: **Multifaceted Microbes**. Ganguli, B. N., and Deshmukh, S.K. (eds.). Boca Raton: CRC press, chap 6, p.189-207, 2007.
- BUSATO, G. R.; GRÜTZMACHER, A. D.; GARCIA, M. S.; GIOLO, F. P.; STEFANELLO Jr., G. J.; ZOTTI, M.J. Preferência para alimentação de biótipos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) por milho, sorgo, arroz e capim-arroz. **Revista Brasileira de Agrociência**, vol.10, n. 2, p. 215-218, 2004.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F. & KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Journal of Microbiology**, vol. 43, p. 895-914, 1997.
- PARRA, J. R. P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 6 ed. 2001. 134 p.
- SCHERWINSKI, K.; WOLF, A.; BERG, G. Assessing the risk of biological control agents on the indigenous microbial communities: *Serratia plymuthica* HRO-C48 and *Streptomyces* sp. HRO-71 as model bactéria. **Bio Control**. vol. 52, p. 87-112, 2007.