



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* TÓXICAS À
Helicoverpa armigera E PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL**

CARLA FERREIRA CAIXETA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2015



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* TÓXICAS À
Helicoverpa armigera E PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL**

CARLA FERREIRA CAIXETA

ORIENTADORA: ROSE GOMES MONNERAT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

PUBLICAÇÃO: 84/2015

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2015**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* TÓXICAS À
Helicoverpa armigera E PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL**

CARLA FERREIRA CAIXETA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM AGRONOMIA.

APROVADA POR:

ROSE GOMES MONNERAT, Dra. Pesquisadora Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Orientadora)/CPF 512.803.701-06/e-mail: rose.monnerat@embrapa.br

MARIA LUCRÉCIA GEROSA RAMOS, Dra. Professora Adjunto unB – FAV (Examinador Interno)/ CPF: 002.094.438-12/ e-mail: lucrecia@unb.

CARLOS MARCELO SILVEIRA SOARES, Dr. Pesquisador Instituto Mato-Grossense do Algodão – IMA-MT (Examinador Externo)/CPF: 490.618.600-91/e-mail: carlosmarcelo@imamt.com.br

BRASÍLIA/DF, 27 DE FEVEREIRO DE 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Caixeta, Carla Ferreira.
Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas à *Helicoverpa armigera* e promotoras de crescimento vegetal. Carla Ferreira Caixeta; orientação de Rose Gomes Monnerat – Brasília, 2015.

82 p. : il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2015.

1. Controle biológico 2. Metabólitos secundários 3. Diversidade genética.

I. Monnerat, R. II. Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas à *Helicoverpa armigera* e promotoras de crescimento vegetal.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

CAIXETA, C. F. **Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas à *Helicoverpa armigera* e promotoras de crescimento vegetal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 82 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Carla Ferreira Caixeta

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: **Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas à *Helicoverpa armigera* e promotoras de crescimento vegetal.**

GRAU: Mestre ANO: 2015

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

Nome: Carla Ferreira Caixeta

CPF: 071.076.756-05

Endereço: SCRN 708/709 bloco H entrada 37 apto 202 – Asa norte – Brasília/DF

CEP: 70.741-680

Tel: (61) 8108-3610 / e-mail: carlacaixeta@hotmail.com

DEDICO

À Deus por ter me concedido as forças necessárias, a perseverança e a fé para realização e concretização deste trabalho. Aos meus pais faço de minha conquista o instrumento de gratidão, respeito, amor, carinho, compreensão e reconhecimento que recebi e

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me guiar por caminhos que às vezes pareceram incertos, mas que no final sempre foram as melhores escolhas.

Agradeço à minha orientadora, **Dra. Rose Monnerat**, pela oportunidade, confiança e pelo privilégio de fazer parte de sua equipe de pesquisa.

À **Dra. LÍlian Praça e Dra. Bárbara Eckstein** pela amizade, paciência e contribuições nos trabalhos.

Ao **Dr. Paulo Queiroz** pelo incentivo, disponibilidade e por toda ajuda.

Ao **Dr. Marcelo Soares** pelo apoio, incentivo e por aceitar participar da banca examinadora.

À **Dra. Érica, Érica, Eriqueta, mamãe da Lalá**, você é um exemplo de pessoa, professora, pesquisadora e mãe, um anjo que apareceu e me mostrou um caminho novo. Muito, muito Obrigada!!!

Ao **Elias** pela amizade e imensa contribuição neste trabalho.

A todos os colegas e funcionários do Prédio de Controle Biológico, em especial ao **Helinho, Isabella, Daniela, Willian, Zilda, Débora, Renata, Pedro, Márcio, Saluana** pela ajuda indispensável e amizade.

Aos que estão na equipe LBE e LCPI, **Neila, Rayane, Sandro, Marcelo Castro, Laura, Zezinho, Flávia, Briana, Anabele, Mayco, Raul, Gabriel, Fernanda**, e aos que já seguiram os seus caminhos, mas que sempre me proporcionaram momentos de descontração, mesmo nas horas mais estressantes de trabalho, sempre tem um que nos faz sorrir.

À **Zonaite, Jório, Marina e Ester** pela amizade e por toda a ajuda nas avaliações, foi essencial.

Aos professores do Programa de Pós-graduação da FAV por todo ensinamento repassado. Em especial a Prof.^a **Cristina Schetino** por me proporcionar um crescimento profissional e pessoal, sempre muito bom conversar com você. Ao Prof. **Cícero Celio e Ernandes Rodrigues** pelo apoio e atenção.

À **Prof.^a Maria Lucrecia** por aceitar participar da banca examinadora e por suas colaborações desde a qualificação.

Aos meus colegas de Pós-graduação, em especial ao **Alex Cortês, Alejandra Ortega, Flívia Fernandes, Sabrina Navas e Silas** que foram o meu apoio dentro e fora da sala de aula, por todas as risadas e conversas incentivadoras.

À **Marla e Cris** pela amizade, por longas conversas, risadas e agradável convivência.

Aos meus amores:

Minha **mãe Célia** por ser a inspiração que me faz querer ser melhor a cada dia e nunca me deixar abater nas dificuldades. Obrigada por nunca me deixar desistir!!

Meu **pai Randolpho** que desde nova me ensinou a ser responsável e dedicada ao trabalho, sei que nunca quis me deixar voar, mas hoje sabe que foi o melhor.

Meu **irmão Adriano** por toda ajuda, sem você eu não conseguiria.

Aos meus **Avós, Tios, Tias, Primas, Primos e Adriane**, muito obrigada por compreenderem a minha ausência e me apoiarem sempre.

As minhas madrinhas **Gisele e Sandra**, minhas mães!! Muito obrigada por todo amor, carinho e por comemorarem comigo todas as minhas conquistas, simplesmente por comporem uma das melhores partes de mim, mesmo a distância.

Amo muito vocês!!

À **Joana, Paulinha, Sol, Márcia, Alisson, Sarah, Paulo, Matheus, Ivan, Augusto, Rosana, Célio** e, a toda a equipe que é muito grande, muito obrigada pela amizade e por todos os momentos de descontração e palavras de incentivo.

As minha amigas **Alessandra, Fernandinha e Flavinha**, que mesmo longe me apoiaram e incentivaram os meus sonhos. Que essa amizade complete mais décadas, enfim que seja para sempre.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento e finalização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!

*A certeza de que estamos apenas começando,
A certeza de que é preciso continuar
E a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar.
Fazer da interrupção um caminho novo,
Fazer da queda um passo de dança,
Fazer do medo uma escada,
Fazer do sonho a ponte.”*

(Fernando Sabino)

ÍNDICE GERAL

DEDICO	v
AGRADECIMENTOS	vi
ÍNDICE GERAL	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO.....	18
2.1 <i>Helicoverpa armigera</i>	18
2.2 <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
2.3 Bactérias promotoras de crescimento vegetal	22
2.4 Mecanismos de promoção de crescimento	23
2.4.1 Produção de sideróforos	24
2.4.2 Produção de fitohormônios.....	24
2.4.3 Fixação de nitrogênio	25
2.4.4 Solubilização de fosfato.....	26
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO ÚNICO - SELEÇÃO DE ESTIRPES DE <i>Bacillus thuringiensis</i> TÓXICAS À <i>Helicoverpa armigera</i> E PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL.....	37
RESUMO	38
ABSTRACT	39
1 INTRODUÇÃO.....	40
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1 Determinação da toxicidade de <i>B. thuringiensis</i> à <i>H. armigera</i>	42

2.1.1	Criação massal de <i>Helicoverpa armigera</i>	42
2.1.2	Cultivo das estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i>	46
2.1.3	Bioensaio seletivo	46
2.1.4	Caracterização bioquímica	47
2.1.5	Caracterização molecular dos genes <i>cry</i>	48
2.2	Determinação da capacidade de promoção de crescimento por estirpes de <i>B. thuringiensis</i>	52
2.2.1	Detecção da produção de sideróforos	52
2.2.2	Detecção e quantificação da produção de ácido indol-acético (AIA)	52
2.2.3	Detecção da solubilização de fosfato inorgânico	53
2.2.4	Detecção da capacidade de fixação assimbiótica de nitrogênio	53
2.2.5	Detecção de genes relacionados ao metabolismo de crescimento vegetal.	54
2.2.5.1	Desenho dos iniciadores	55
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.1	Criação massal de <i>Helicoverpa armigera</i>	57
3.2	Bioensaio seletivo	59
3.3	Caracterização bioquímica e molecular de genes <i>cry</i> das estirpes de <i>B. thuringiensis</i>	62
3.4	Determinação da capacidade de promoção de crescimento por estirpes de <i>B. thuringiensis</i>	65
	CONCLUSÃO	73
	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	74
	REFERÊNCIAS	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do modo de ação de toxinas Cry para lepidópteros.	21
Figura 2 – Pupas de fêmeas e de machos de <i>H. armigera</i>	44
Figura 3 - Gaiola de adultos de <i>H. armigera</i>	44
Figura 4 - Barbante de algodão perdurado na parte superior da gaiola para realização das posturas de <i>H. armigera</i>	45
Figura 5 - Lagartas de <i>H. armigera</i> individualizadas em copos plásticos com tampa contendo dieta artificial.....	46
Figura 6 - Placa de cultura de células com 24 poços com dieta artificial de <i>H. armigera</i>	47
Figura 7 - Vias dependentes de triptofano para biossíntese de AIA.	55
Figura 8 - Padrão de RFLP-PCR digerido com a enzima BstZ17I.	57
Figura 9 - Barbante de algodão com ovos de <i>H. armigera</i>	58
Figura 10 - Lagartas de <i>H. armigera</i> de diferentes colorações.	58
Figura 11 - Mariposas de <i>H. armigera</i> – fêmea (esquerda) e macho (direita).	59
Figura 12 - Perfil protéico das estirpes selecionadas de <i>B. thuringiensis</i>	62
Figura 13 - Produtos de PCR obtidos para o gene <i>fosfatase ácida</i>	70
Figura 14 - Produtos de PCR obtidos para o gene <i>biossíntese de sideróforos</i>	71
Figura 15 - Produtos de PCR obtidos para o gene <i>ipdC</i>	71

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1– Ingredientes autoclaváveis para a dieta artificial para alimentação das lagartas de <i>H. armigera</i>	43
Tabela 2 – Ingredientes não autoclaváveis para a dieta artificial para alimentação das lagartas de <i>H. armigera</i>	43
Tabela 3 - Dieta líquida para alimentação dos adultos de <i>H. armigera</i>	45
Tabela 4 - Características dos iniciadores utilizados para a detecção dos genes <i>cry</i> em estirpes de <i>B. thuringiensis</i>	49
Tabela 5 - Característica dos iniciadores utilizados para detecção dos genes <i>fosfatase ácida</i> (metabolismo de solubilização de fosfato); <i>sideróforos</i> (capacidade de produzir complexos com ferro) e <i>iam1</i> , <i>iam2</i> e <i>ipdC</i> (produção de ácido indol-acético) em estirpes de <i>B. thuringiensis</i>	54
Tabela 6- Característica dos iniciadores desenhados para a detecção dos genes <i>iam1</i> , <i>iam2</i> e <i>ipdC</i> em estirpes de <i>B. thuringiensis</i>	56
Tabela 7 – Resultados de bioensaio seletivo contra <i>H. armigera</i>	60
Tabela 8 – Estirpe, sorotipo, conteúdo gênico e perfil protéico das estirpes de <i>B. thuringiensis</i> que apresentaram 100% de mortalidade à <i>H. armigera</i>	63
Tabela 9 – Caracterização bioquímica das estirpes de <i>B. thuringiensis</i> na produção de metabolitos secundários com capacidade de promoção de crescimento vegetal.....	65
Tabela 10 – Caracterização molecular das estirpes de <i>B. thuringiensis</i> para a presença dos genes de promoção de crescimento vegetal.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
°C	Graus Celsius
µg ml ⁻¹	Microgramas por mililitro
atm	Pressão atmosférica
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CaHPO ₄	Fosfato de cálcio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
FeCl ₃	Cloreto de Ferro III
g	Gramas
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio dibásico
kDa	Quilodalton
L	Litro
M	Molar
mA	Miliampère
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
NaCl	cloreto de sódio
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGPR	Plant growth promoting rhizobacteria
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoride
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism

rpm	rotação por minuto
s	Segundo
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturado com SDS
T _m	Temperatura de anelamento
Tris-HCl	Tris aminometano-ácido clorídrico
TSL	tripticaseína de soja líquido
V	Volt
β	Beta
δ	Delta
μL	Microlitro

RESUMO

Helicoverpa armigera (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie extremamente polífaga, se alimenta das mais diferentes culturas de interesse econômico e tem grande adaptabilidade às várias condições climáticas consideradas uma praga de importância. *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria cosmopolita que expressa diversas proteínas durante seus estágios de crescimento que possuem atividade entomopatogênica, podendo atuar como importante agente de controle biológico, além de ser capaz de colonizar o interior das plantas promovendo o seu crescimento. Com a necessidade de se conhecer cada vez mais e explorar as potencialidades deste microrganismo o estudo objetivou selecionar 100 estirpes de *Bacillus thuringiensis* com toxicidade para *Helicoverpa armigera* e potencial para promoção de crescimento vegetal. Das estirpes avaliadas 23 apresentaram 100% de mortalidade para *H. armigera*, sendo quinze pertencentes às subsp. *kurstaki*, *aizawai*, *tolworthi*, *fokuokaensis*, *sotto*, *morrisoni*, *thuringiensis* e oito não sorotipadas. As estirpes apresentam perfil proteico de 130 e 65 kDa, sendo que algumas apresentaram apenas uma das proteínas e fragmentos de DNA de tamanho esperado para a detecção dos genes *cry1* e *cry2*. Na detecção da capacidade de promoção de crescimento *in vitro*, nenhuma estirpe apresentou a capacidade de produção de sideróforos, solubilização de fosfatos e fixação biológica de nitrogênio. Na produção de AIA todas as estirpes foram positivas e a quantidade variou de 1,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (estirpe S93) a 7,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (estirpe S1983). Das 100 estirpes analisadas 45 apresentaram amplicons esperados para todos os genes avaliados, sendo que 71 estirpes apresentaram amplicons de tamanhos esperados para o gene *fosfatase ácida*, 57 foram positivos para os genes *sideróforos*. Os genes envolvidos nas rotas de biossíntese do hormônio AIA se mostraram mais frequentes em estirpes de Bt, sendo que das estirpes analisadas 91 foram positivos para a presença do gene *ipdC*, 97 para o genes *iam1* e 93 para o gene *iam2*. *B. thuringiensis* pode ser utilizado no controle de *H. armigera* e possui potencial como inoculante para a promoção de crescimento vegetal, abrindo novas perspectivas para o uso agrônomico.

Palavras-chave: controle biológico, metabólitos secundários, diversidade genética.

ABSTRACT

Helicoverpa armigera (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) is an extremely polyphagous species, feeding from different types of crops with economic importance and has great adaptability to various climatic conditions, considered an important pest. *Bacillus thuringiensis* is a cosmopolitan bacteria that express different proteins during their growth stages with entomopathogenic activity, and may act as an important biological control agent, besides being capable to colonize the interior of plants, promoting its growth. To know more and explore the potentials of this microorganism, the aimed of this work to select 100 strain of *Bacillus thuringiensis* with toxicity to *Helicoverpa armigera* and potential for plant growth promotion. 23 strains showed 100% the mortality against *H. armigera*, of which fifteen belonged to subsp. *kurstaki*, *aizawai*, *tolworthi*, *fokuokaensis*, *sotto*, *morrisoni*, *thuringiensis* and eight without serotype. Some strains exhibited the profile of 130 and 65kDa, other showed just one of the proteins and the amplicons with the expected size of *cry1* and *cry2* gene. *In vitro* detection of growth promotion capability, showed that no strain had the siderophore production capability, phosphate solubilization and biological fixation of nitrogen. All strains tested were capable of produce IAA, and the amount varied from 1,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (S93 strain) to 7,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (1983 strain). 45 of the 100 analyzed strains showed the expected amplicons for all the studied genes, 71 strains showed the expected amplicon size for the *acid phosphatase* gene, 57 were positive for *siderophore* gene. The genes involved in the biosynthesis of IAA hormone were more frequent in Bt strains, 91 strains were positive for the presence of *ipdC* gene, 97 were positive for *iam1* gene, and 93 for *iam2* gene. *B. thuringiensis* can be used in biological control against *H. armigera* and has a great potential to promote plant growth, creating new perspectives for agronomic use.

Keywords: Biological control, secondary metabolite, genetic diversity.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta um papel de destaque no cenário mundial pela quantidade e qualidade de sua produção agrícola. Baseada no modelo convencional utiliza de forma intensiva, fertilizantes químicos e agrotóxicos, o que torna o País um dos maiores consumidores de insumos agrícolas no mundo.

Impulsionada pelo ambiente favorável, com duas safras em um ano em algumas regiões, associado à melhoria da fertilidade dos solos, à irrigação e ao desenvolvimento de plantas melhor adaptadas, a agricultura brasileira experimentou uma grande expansão na última década. Todavia, esse crescimento não foi acompanhado pela indústria brasileira de insumos agrícolas, tornando o País ainda mais dependente da importação de fertilizantes e agrotóxicos. Essa situação torna os produtores quase reféns do mercado internacional, que estabelece os preços, bem como as quantidades de fertilizantes a serem disponibilizadas.

Caracterizado pelo monocultivo realizados em extensas áreas, o sistema de produção agrícola do Brasil favorece o surgimento de elevados níveis populacionais de vários insetos, os quais pelos prejuízos econômicos ocasionados passaram a ser considerados pragas.

Detectada na safra 2012/2013, mas provavelmente com introdução anterior a essa data, *Helicoverpa armigera*, até então considerada uma praga quarentenária A1, rapidamente obteve o status de praga e causou perdas econômicas significativas em vários estados brasileiros, principalmente no oeste da Bahia. Espécie polífaga, tem preferência em se alimentar das estruturas reprodutivas das plantas, como flores, inflorescências, frutos e vagens. Todavia, também ataca brotos, folhas e caules. No Brasil, há registro de sua ocorrência em cultivos de algodão, soja, milho, tomate e citros.

Na tentativa de reduzir os danos ocasionados pela *H. armigera*, o MAPA liberou em 2013, em caráter emergencial, diversos produtos fitossanitários, dentre eles o benzoato de emamectina, inseticida de classe toxicológica I, produto extremamente tóxico e altamente perigoso ao meio ambiente. O emprego desse e de outros inseticidas convencionais impactam na elevação de custos de produção e podem degradar recursos naturais, contaminando o solo e a água e comprometendo a fauna benéfica como polinizadores e inimigos naturais das pragas.

O cenário acima descrito estimula o desenvolvimento de novas abordagens, que venham a auxiliar a agricultura brasileira, mas que não impliquem na geração de mais dependência externa ou aumentem os já severos impactos ambientais. Neste contexto, o emprego de *Bacillus thuringiensis*, uma bactéria entomopatogênica e que também tem a capacidade de estimular o crescimento de plantas como já demonstrado em alface (GOMES *et*

al., 2014), leguminosas (TANUJA *et al.*, 2003), amendoim (WANG *et al.*, 2014) e ainda como inseticida sistêmico (PRAÇA *et al.*, 2012) pode vir a ser uma alternativa interessante.

O presente trabalho tem por objetivo selecionar estirpes de *B. thuringiensis*, que além de serem tóxicas à *H. armigera*, apresentem potencial para promover o crescimento vegetal.

2 REVISÃO

2.1 *Helicoverpa armigera*

Helicoverpa armigera (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) apresenta ampla distribuição geográfica, sendo registrada na Europa, Ásia, África, Oceania (GUO, 1997; AVILLA *et al.*, 2005; VASSAL *et al.*, 2008). Na safra 2012/13 foi identificada no Brasil, nos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso e São Paulo (CZEPAK *et al.*, 2013; SPECHT *et al.*, 2013; BUENO *et al.*, 2014).

Essa espécie é extremamente polífaga, registrada como um inseto prejudicial em 181 espécies de plantas cultivadas e silvestres em pelo menos 45 famílias (SRIVASTAVA *et al.*, 2010). Alimenta-se das mais diferentes culturas de interesse econômico, como milho, soja, algodão, tomate (AVILLA *et al.*, 2005; VASSAL *et al.*, 2008), feijão, sorgo, milheto, feijão guandu, trigo (ÁVILA *et al.*, 2013) e citros (BUENO *et al.*, 2014). Devido a sua preferência pelas partes reprodutivas e sua habilidade de atacar um grande número de hospedeiros, recebeu o status de praga de importância econômica (CUNNINGHAM *et al.*, 1999).

É uma espécie que apresenta grande mobilidade, podendo o adulto alcançar uma distância de até 1000 km com seus voos (PEDGLEY, 1985). Além de possuir alta capacidade de sobrevivência, podendo completar várias gerações ao ano, pois seu período de ovo a adulto dura de quatro a seis semanas (FITT, 1989). Este fato pode ser atribuído à sua fertilidade elevada, comportamento de migração, elevada adaptabilidade a várias condições climáticas e do desenvolvimento de resistência à ampla gama de inseticidas (NASERI *et al.*, 2010).

Na fase adulta, as fêmeas de *H. armigera* são capazes de ovipositar de 1000 a 1500 ovos num período de 12 a 15 dias. As mariposas preferem a face superior das folhas ou superfícies mais ásperas e os ovos são colocados isolados (SRINIVASAN *et al.*, 2013).

O período larval dura de 13 a 25 dias e é composto por 5 estádios. As lagartas variam da cor verde ao preto e com listras brancas longitudinais. No último estágio as lagartas deixam a parte aérea e migram para o solo, onde empupam (CZEPAK *et al.*, 2013).

As lagartas de *H. armigera* se alimentam de folhas e caules, porém, têm preferência por brotos, inflorescências, frutos e vagens (WANG & LI, 1986).

Os inseticidas químicos são largamente utilizados nos ambientes agrícolas como uma alternativa rápida (ÁVILA, *et al.*, 2013), com o intuito de ajudar os produtores a controlar em caráter emergencial o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no início de 2013, liberou o inseticida benzoato de emamectina.

O controle de *H. armigera* pode ser realizado por outros métodos e não somente com produtos químicos (ÁVILA, *et al.*, 2013). Produtos formulados a base de *Bacillus thuringiensis* são uma alternativa promissora contra este inseto, pois sua atividade entomopatogênica já foi comprovada contra vários insetos da ordem Lepidoptera, podendo ser mais um método utilizado no manejo desta praga.

Como *H. armigera* era considerada uma praga exótica para o Brasil, pesquisas direcionadas a avaliação da suscetibilidade as toxinas de *B. thuringiensis* são importantes a fim de auxiliar na escolha de um produto eficiente.

2.2 *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis (Berliner, 1911) (Bt) é uma bactéria Gram positiva, aeróbia, pertencente à família Bacillaceae. Pode ser encontrada no mundo todo, e nos mais diferentes substratos como solo, água, insetos mortos, superfície de plantas (BRAVO *et al.*, 1998) e no interior das raízes (MONNERAT *et al.*, 2003).

A organização entre várias estirpes de *B. thuringiensis* foi proposto por Barjac & Bonnefoi (1962) agrupando taxonomicamente por sorotipos ou subespécies, baseada em propriedades bioquímicas, na reação de aglutinação de antígenos flagelares das células vegetativas.

Durante seu crescimento as estirpes de *B. thuringiensis* produzem diferentes fatores de virulência, como as δ -endotoxinas, Vip, α -exotoxina, β -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (HOFTE & WHITELEY, 1989; HANSEN & SALAMITOU, 2000).

As protoxinas “Vip” (do inglês: Vegetative Insecticidal Proteins) são proteínas produzidas e liberadas durante a fase inicial do crescimento das bactérias, por não formarem cristais protéicos foram excluídas da nomenclatura Cry (ESTRUCH *et al.*, 1996). As toxinas binárias, Vip1 e Vip2 atuam no controle de algumas espécies das ordens Coleoptera (WARREN, 1997) e Hemiptera (SAMPURNA & MAITI, 2011); as proteínas da família Vip3A controlam algumas espécies da ordem Lepidoptera (ESTRUCH *et al.*, 1996).

O modo de ação das proteínas Vip3A ainda estudado mostra ter atuação no epitélio intestinal do inseto assim como as proteínas Cry. Devido sua forma solúvel, essas se ligam mais rapidamente aos receptores da membrana das células epiteliais do intestino dos insetos susceptíveis, resultando na degeneração da camada epitelial (YU *et al.*, 1997). A proteína Vip3A quando ativada liga-se aos receptores localizados nas microvilosidades das células colunares do epitélio intestinal das lagartas susceptíveis (BRAVO *et al.*, 2005).

As δ -endotoxinas são formadas durante a fase estacionária do seu ciclo de crescimento na forma de inclusões protéicas cristalinas (BRAVO *et al.*, 2005) ou também chamadas de toxinas Cry ou Cyt, sendo estas as responsáveis pela atividade entomopatogênica desta bactéria (MONNERAT & BRAVO, 2000; BRAVO *et al.*, 2005).

As proteínas Cry estão classificadas em 73 grupos organizados em diferentes subgrupos, que são codificadas por 630 genes cry já sequenciados, além dos três grupos de toxinas Cyt que são codificadas por 11 genes cyt. Estas proteínas são agrupadas em função do grau de identidade de seus aminoácidos e sua atualização constata pode ser visualizada via Internet no endereço: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/ (CRICKMORE *et al.*, 2015).

As proteínas Cry são tóxicas para insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera e nematoides (SOBERÓN *et al.*, 2007) e as proteínas Cyt ativas para insetos da ordem Diptera (BRAVO *et al.*, 2005).

Os cristais de Bt (Figura 1), ao serem ingeridos pelas larvas de insetos suscetíveis, são solubilizados no intestino médio que apresenta um pH em torno de 9,5, liberando uma ou mais proteínas (KNOWLES, 1994). As toxinas Cry ao serem ativadas pelas proteases do intestino se ligam a receptores específicos nas microvilosidades das células epiteliais do intestino médio (MONNERAT & BRAVO, 2000; BRAVO *et al.*, 2005), já as toxinas Cyt se interagem diretamente com os lipídeos da membrana (PROMDONKOY & ELLAR, 2003), ambas formadoras de poro (PFT) (BRAVO *et al.*, 2011).

Com a ocorrência da ligação destas toxinas aos receptores específicos e abertura ou formação dos poros na membrana intestinal das larvas inicia-se um desequilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular, ocasionando a perda da integridade da membrana (LIANG *et al.*, 1995; RABINOVITCH *et al.*, 2000).

Os sintomas apresentados pelas larvas dos insetos suscetíveis após ingerirem os cristais e esporos de *B. thuringiensis* são: perda de apetite e abandono do alimento, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia geral e por fim morte do inseto. (ARONSON *et al.*, 1986).

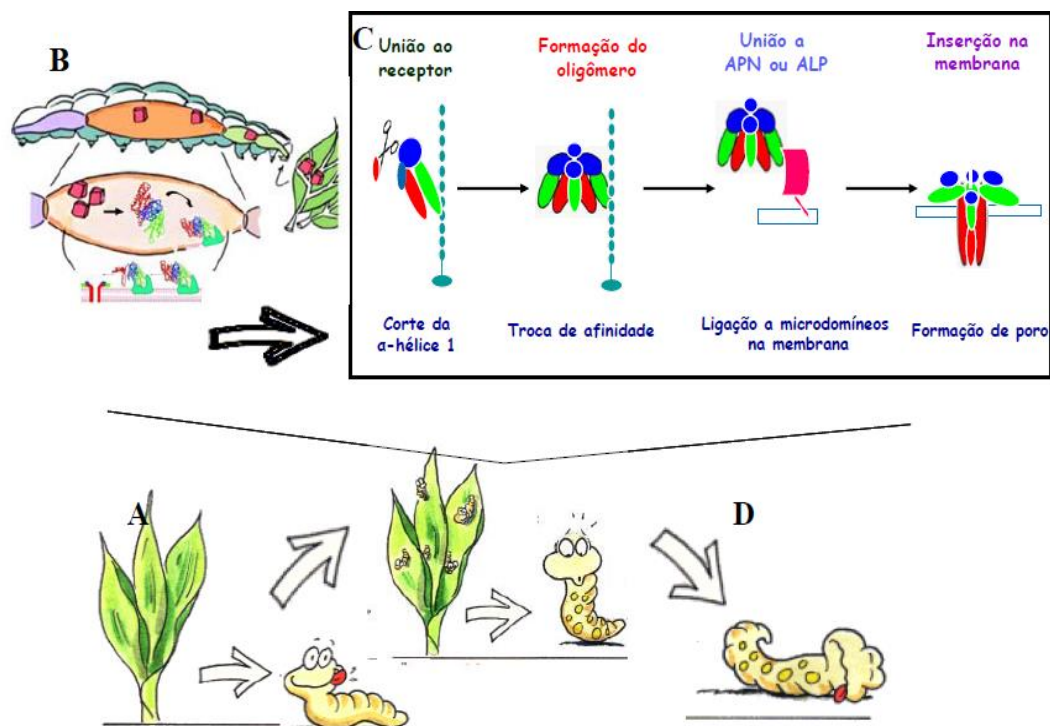


Figura 1 - Esquema do modo de ação de toxinas Cry para lepidópteros. A – O inseto ingere os cristais; B – no intestino médio da larva os cristais são solubilizados e ativados em proteínas que se ligam ao receptor; C – Esta ligação resulta na ativação de vias de sinalização intracelulares. Após se ligar ao receptor, há a inserção da toxina na membrana, formando poros e ativando vias de sinalização intracelular que podem ativar respostas apoptóticas e choque osmótico induzidos pela formação do poro; D – levando o inseto à morte (Adaptado de Bravo *et al.*, 2007).

A aplicação de *B. thuringiensis* no controle de insetos pragas é uma ferramenta poderosa por não contaminar o meio ambiente, ser altamente específica devido à presença de receptores específicos no intestino médio dos insetos-alvo e pela ausência de interação dos receptores dos insetos benéficos e vertebrados (PIGOTT & ELLAR 2007; BRAVO *et al.*, 2011).

Além da sua utilização como inseticida biológico estão sendo realizados estudos para verificar o seu potencial como inoculante vegetal. *B. thuringiensis* como inoculante foi testado em alface (GOMES *et al.*, 2003), soja (BAI *et al.*, 2003), leguminosas (TANUJA *et al.*, 2013), algodão (SANTANA, 2014) e amendoim (WANG *et al.*, 2014) e os resultados obtidos apontaram o seu potencial como uma alternativa promissora na promoção de crescimento vegetal.

2.3 Bactérias promotoras de crescimento vegetal

Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR – Plant growth-promoting rhizobacteria) são bactérias com capacidade de colonizar as raízes e que exercem efeitos benéficos no crescimento e desenvolvimento das plantas (CHOUDHARY & JOHRI, 2009).

A utilização de PGPR permite melhor absorção de água e nutrientes pelas plantas e a consequente diminuição do uso de fertilizantes e pesticidas químicos proporcionando uma maior sustentabilidade do sistema de produção (CANDIDO *et al.*, 2013).

Estirpes com atividade PGPR já relatados pertencem aos gêneros *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Thiobacillus* (CHOUDHARY & JOHRI, 2009), *Mesorrhizobium* (AHMAD *et al.*, 2008), *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter* (HUREK & REINHOLD-HUREK, 2003).

Porém já foram relatadas evidências de que a promoção de crescimento vegetal é maior quando induzido por bactérias endofíticas do que apenas por rizobactérias (TANUJA *et al.*, 2013).

As bactérias endofíticas são aquelas que possuem capacidade de colonizar os tecidos internos das plantas (TANUJA *et al.*, 2013), ou seja, conseguem atravessar o córtex da raiz e atingir o sistema vascular sendo encontrado no caule e nas folhas (PRAÇA *et al.*, 2012; COMPANT *et al.*, 2005).

As PGPRs podem estimular o crescimento de forma direta através da fixação de nitrogênio, produção de hormônio vegetal, solubilização de fósforo e produção de sideróforos (SZENTES *et al.*, 2013) ou podem viver de forma endofítica apenas para se proteger de ambiente competitivo sem ganhar ou provocar nenhum dano (WELLINGTON & BORGES, 2004).

Nos solos existem diversas populações de bactérias aeróbicas formadoras de endósporos que podem contribuir direta e indiretamente na produtividade das culturas, como exemplo *Bacillus spp.* (CHOUDHARY & JOHRI, 2009).

A maioria tem a capacidade de se desenvolver de forma endofítica, além de ser um organismo do solo de vida livre como *B. cereus*, *B. insolitus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *Bacillus subtilis*, *P. polymyxa*, (SHISHIDO *et al.*, 1999) e *B. thuringiensis* (MONNERAT *et al.*, 2003; PRAÇA *et al.*, 2012) e também promoveram o crescimento vegetal (GOMES *et al.*, 2003; TANUJA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014).

Trabalhos realizados por Tanuja *et al.* (2013) e Praça *et al.* (2012) com diferentes estirpes de *B. thuringiensis* verificaram a capacidade destas de colonizarem o interior das raízes e migrarem endofiticamente para o caule e folhas das plantas.

Os mecanismos de promoção de crescimento vegetal pelas bactérias podem ser influenciados por diversos fatores abióticos e bióticos (BLOEMBERG & LUTGTENBERG, 2001), mostrando a necessidade de estudos aprofundados sobre os mecanismos e dos seus efeitos benéficos nas condições de campo.

2.4 Mecanismos de promoção de crescimento

A promoção de crescimento vegetal por microrganismos é favorecida por mecanismos diretos como a fixação biológica de nitrogênio, produção de fitohormônios, solubilização de fosfato e disponibilização de outros nutrientes (STURZ *et al.*, 2000; SZENTES *et al.*, 2013) e/ou por mecanismos indiretos como o controle biológico de fitopatógenos e insetos (AZEVEDO *et al.*, 2000; STURZ *et al.*, 2000) pelo aumento da resistência a estresses bióticos e abióticos (BULGARELLI *et al.*, 2013) e produção de sideróforos (SHARMA & JOHRI, 2003).

Os mecanismos de promoção do crescimento vegetal, apresentados por estes microrganismos podem ser explorados em benefício de uma agricultura mais sustentável e de menor impacto ambiental (JAMES & BALDANI, 2012). As bactérias que apresentam mais de uma característica para a promoção de crescimento são almejadas para uma possível aplicação em campo (VERMA *et al.*, 2001).

Desta forma, a exploração e utilização de microrganismos eficientes na promoção do desenvolvimento vegetal podem auxiliar na sustentabilidade da atividade agrícola pela diminuição do uso de insumos derivados – direta ou indiretamente – do petróleo (DOBBELAERE *et al.*, 2003; LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009).

O crescimento e desenvolvimento vegetal muitas vezes são respostas da produção de reguladores de crescimento produzidos por diferentes espécies de bactérias associadas aos vegetais (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

2.4.1 Produção de sideróforos

O ferro é um nutriente essencial para inúmeros processos biológicos, como respiração e síntese de DNA e componente de proteínas envolvidas no processo de transferência de elétrons (PIERRE & FONTECAVE, 1999).

É um dos minerais mais abundantes na Terra, porém ele está relativamente indisponível no solo para a assimilação direta pelos microrganismos. Para superar esse problema, os microrganismos do solo secretam os sideróforos (DOBBELAERE *et al.*, 2003).

Sideróforos bacterianos são moléculas de baixo peso molecular que são produzidas também por PGPRs e que se ligam ao ferro com alta afinidade (GRAY & SMITH, 2005; SHARMA & JOHRI, 2003). Podem ser produzidos por bactérias dois tipos de sideróforos: o hidroxamato e o catecol (NEILANDS & NAKAMURA, 1991).

O complexo ferro-sideróforo não é prejudicial para as plantas, sendo que algumas conseguem capturar esse complexo para dentro de suas células, onde o ferro é liberado e disponibilizado para os processos biológicos (CROWLEY *et al.*, 1988), além de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos para as plantas (SHARMA & JOHRI, 2003)

O sideróforo tem a função de transportar o ferro através da membrana celular. A entrada do ferro no citoplasma acontece depois que o ferro é reduzido e/ou desmembrado do seu ligante, podendo o sideróforo ser reciclado para iniciar novamente o processo (NEILANDS, 1995).

2.4.2 Produção de fitohormônios

Dos fitohormônios produzidos por bactérias a auxina é a mais estudada, sendo que a capacidade de síntese deste fitohormônio tem distribuição ampla entre bactérias associativas, e acredita-se que 80% das bactérias da rizosfera produzem auxinas (PATTEN & GLICK, 1996).

A auxina é o hormônio vegetal produzido em maior quantidade, sendo o seu composto mais estudado o ácido indolacético (AIA) (PATTEN & GLICK, 1996). A auxina tem como principais funções promover o alongamento celular, divisão, diferenciação celular e de tecidos e a formação radicular, além de aumentar a resistência a fatores de estresse (TSAVKELOVA *et al.*, 2006; TAIZ & ZEIGER, 2006). O triptofano tem sido identificado como a principal molécula precursora da biossíntese de AIA em bactérias (TSAVKELOVA *et al.*, 2006).

A biossíntese de AIA por L-triptofano pode ocorrer por duas vias distintas, uma pela enzima chamada ipdC ou IpyA (índole-3pyruvate descarboxylase) (LEBUHN & HARTMANN, 1993) e outra pela enzima IAM (indol-3-acetaldeído) (BROEK *et al.*, 1999).

2.4.3 Fixação de nitrogênio

O nitrogênio é um dos elementos mais importantes para o desenvolvimento das plantas (GUIMARÃES *et al.*, 2003), por ser constituinte de diversas moléculas como ácidos nucléicos, aminoácidos, bases nitrogenadas, clorofila e outros (FERREIRA, 2008; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

É o elemento mais abundante na atmosfera sendo encontrado na forma de N₂, porém essa forma química é inacessível para os seres eucariotos e para a maioria dos procariotos. Alguns microrganismos possuem uma enzima chamada nitrogenase, que permite a estes transformarem o N₂ em fontes assimiláveis pelos vegetais e outros seres vivos, sendo denominados de fixadores de nitrogênio ou diazotróficos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A utilização de microrganismos que fixam nitrogênio do ar e melhoram o crescimento e desenvolvimento vegetal, contribuem para a diminuição do uso de adubos nitrogenados e conseqüentemente a contaminação do meio ambiente (BARRAQUIO, 1997; CHOUDHURY & KENNEDY, 2004; GRAY & SMITH, 2005).

O uso extensivo de fertilizantes nitrogenados na agricultura gera diversos problemas, sendo o ambiental provocado devido grande parte dos fertilizantes adicionados ao solo serem consumido por bactérias (que oxidam o nitrogênio, liberando óxido nitroso e óxido nítrico na atmosfera) ou lixiviado pelas águas até o lençol freático, causando a eutrofização de rios e lagos (LEWIS *et al.*, 1984).

As espécies fixadoras de nitrogênio são na sua maioria de vida livre e ocorrem nos diferentes tipos de solos, rizosferas, água doce ou salgada, em associações ou não com fungos e outros animais. Podem ainda viver endofiticamente nas plantas colonizando os tecidos internos (CRAWFORD *et al.*, 2000; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

No final dos anos 90 foram relatados como microrganismos endofíticos diazotróficos, os pertencentes aos gêneros *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (CHANWAY, 1998).

2.4.4 Solubilização de fosfato

O fósforo é o nutriente mais abundante nos solos, porém é o maior limitante do crescimento vegetal, por ser essencial ao desenvolvimento das plantas. Esse elemento é o componente principal de nucleotídeos, e está relacionado com o armazenamento e transferência de energia sob forma de ATP (NOVAIS *et al.*, 2007; FORNASIERI FILHO, 1992).

Microrganismos presentes no solo são capazes de solubilizar fosfato mineral insolúvel pela produção de vários ácidos orgânicos que acidificam o solo, liberando íons ortofosfato solúveis, que podem ser captados pelas plantas (JONES, 1998).

A solubilização de compostos orgânicos fosfatados por microrganismos só acontece quando ocorre a liberação da enzima fosfatase (GYANESHWAR *et al.*, 2002; GARCIA *et al.*, 1992) ou fosfotransferases, classificadas em ácidas ou alcalinas de acordo com o pH ótimo de atividade. Estas enzimas podem ser secretadas fora da membrana plasmática, ou permanecerem retidas na membrana como proteínas solúveis (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999).

Entre os gêneros relatados com a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico estão *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999).

Considerando que a disponibilidade de P é uma etapa limitante para a nutrição da planta, a habilidade em solubilizar fosfato inorgânico por bactérias associativas representa um grande potencial para a promoção do crescimento vegetal (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Selecionar estirpes de *Bacillus thuringiensis* com toxicidade para *Helicoverpa armigera* e potencial para promoção de crescimento vegetal.

3.2 Objetivos Específicos

- Selecionar estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas à *H. armigera*;
- Caracterizar as estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas à *H. armigera* por métodos bioquímicos e moleculares;
- Identificar e selecionar estirpes de *B. thuringiensis* produtoras de auxinas, sideróforos, solubilizadoras de fosfato inorgânico e fixadoras de nitrogênio de forma assimbiótica *in vitro*;
- Caracterizar estirpes de *B. thuringiensis* por método molecular para os genes de promoção de crescimento.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v. 163, p. 173-181, 2008.
- ARONSON, A.I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiology Review**, v. 50, p. 1-24, 1986.
- ÁVILA, C.J.; VIVIAN, L.M.; TOMQUEISKI, G. V. **Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, p. 1-12, 2013 (Circular técnica n 23).
- AVILLA, C.; VARGAS-OSUNA, E.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; FERRÉ, J.; GONZÁLEZ-ZAMORA, J.E. Toxicity of several δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Spain. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 90, p. 51–54, 2005.
- AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI-JR, W. **Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos**. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) Controle Biológico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, cap. 3, p. 57-93, 2000.
- BAI, Y.X., ZHOU, X., SMITH, D.L. Enhanced Soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. **Crop Science**, v. 43, p. 1774–1781, 2003.
- BARJAC, H.; BONNEFOI, A. Essai de classification biochimique et serologique de 24 souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*. **Entomophaga**, v.7, p. 5-31, 1962.
- BARRAQUIO, W.L.; REVILLA L.; LADHA, J.K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, v. 194, p.15-24, 1997.
- BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p. 343-350, 2001.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: GILBERT, L. I., LATROU, K., GILL, S. S. (Ed.). *Comprehensive Molecular Insect Science*. **Amsterdam: Elsevier BV**. p. 175-206, 2005.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v.49, p. 423–435, 2007.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 41, p. 423–431, 2011.

BROEK, A.V. Auxins upregulate expression of the indole-3- Pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, p. 1338-1342, 1999.

BUENO, R.C.O.F.; YAMAMOTO, P. T.; CARVALHO, M.M. BUENO, N. M. Occurrence of *Helicoverpa armigera* (HÜBNER, 1808) on citrus in the state of São Paulo, Brazil. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 36, n. 2, p. 520-523, 2014.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VAN THEMAAT, E. V. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.

CANDIDO, V.; CAMPANELLI, G.; D'ADDABBO, T.; CASTRONUOVO, D.; RENCO, M.; CAMELE, I. Growth and yield promoting effect of artificial mycorrhization combined with different fertiliser rates on field-grown tomato. **Italian Journal of Agronomy**, p.8-22, 2013.

CHANWAY, C.P. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. **Sydowia**, v.50, p. 149-170, 1998.

CHOUDHARY, D.K.; JOHRI, B.N. Interactions of *Bacillus spp.* and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). **Microbiological Research**, v.164, p.493-513, 2009.

CHOUDHURY, A.T.M.A.; KENNEDY, I.R. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production, **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, p. 219-227, 2004.

COMPANT, S.; REITER, B.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; AIT BARKA, E. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by a plant growth promoting bacterium, *Burkholderia* sp. strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.1685–1693, 2005.

CRAWFORD, N.M., Nitrogen and sulfur. In: BUCHANAN, B.B; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of plants**. Rockville: American Society of plant physiologists, p. 786-849, 2000.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H. **Bacillus thuringiensis toxin nomenclature**. Disponível em: http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/. Acesso em: 30 janeiro 2015.

CROWLEY, D.E.; REID, C.P.P.; SZANISZLO, P.J. Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. **Plant Phys**, v.87, p. 680-685, 1988.

CUNNINGHAM, J.P.; ZALUCKI, M.P.; WEST, S.A. Learning in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): a new look at the behaviour and control of a polyphagous pest. **Bulletin of Entomological Research**, v. 89, n. 3, p. 201-207, 1999.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K.C.; VIVAN, L.M.; GUIMARÃES, H.O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, p.110-113, 2013.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Crit Rev Plant Sci**, v. 22, p. 107-149, 2003.

ESTRUCH, J.J.; WARREN, G.W.; MULLINS, M.A.; NYE, G.J.; CRAIG, J.A.; KOZIEL, M.G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p.5389-5394, 1996.

FERREIRA, J.S. **Qualidade de inoculante, inoculação e reinoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em duas variedades de arroz irrigado**. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

FIGUEIREDO, M.V.B.; SELDIN, L.; ARAUJO, F.F.; MARIANO, R.L.R. **Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications**. In: Plant growth and health promoting bacteria. Berlin: Springer, v.18, p.21-43, 2010.

FITT, G. P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 34, n. 1, p. 17-52, 1989.

FORNASIERI FILHO, D. **A cultura do milho**. Jaboticabal: FUNEP, 1992.

GARCIA, C.; FERNANDEZ, T.; COSTA, F. CERRANTI, B.; MASCIANDARO, G. Kinetics of phosphatase activity in organic wastes. **Soil Biol Biochem**. v. 25, p. 361-365, 1992.

GOMES, A.M.A.; MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; MESQUITA, J.C.P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito da utilização de *Bacillus spp.* na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 699-703, outubro-dezembro 2003.

GRAY, E.J.; SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology And Biochemistry**, v. 37, p. 395-412, 2005.

GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Agronomia**, v.37, p.25-30, 2003.

GUO, Y.Y. Progress in the researches on migration regularity of *Helicoverpa armigera* and relationships between the pest and its host plants. **Acta Entomologica Sinica**, v. 40, n. 1, p. 1-6, 1997.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, p. 83-93, 2002.

HANSEN, B.M., SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application** (Charles, J. *et al.*, eds), p. 41-64, Kluwer Academic Publishers, 2000.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. *Azoarcus* spp. strain BH72 as a model for nitrogen fixing grass endophytes. **Journal Biotechnology**, p.106:169, 2003.

JAMES, E.K.; BALDANI, J.I. The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. **Plant and Soil**, v. 356, p. 1-3, 2012.

JONES, D.L. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. **Plant Soil**, v. 205, p. 25-44, 1998.

KNOWLES, B. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Adv. Insect. Physiol**, v.24, p. 275-308, 1994.

LEBUHN, M.; HARTMANN, A. Method for the determination of indole-3-acetic acid and related compounds of L-tryptohan catabolism in soils. **Journal of Chromatography**, v. 629, p. 255-266, 1993.

LEWIS, W.M.; SAUNDERS, J.F.; CRUMPAKER, D.W.; BRENDENCKE, C.M. Eutrophication and land use, Lake Dillon, Colorado. **Ecological Studies**, v.46, 202 p., 1984.

LIANG, Y., PATEL, S.S.; DEAN, D.H. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA-endotoxins to *Gypsy moth* brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. **J. Biol. Chem**, 1995.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 541-556, 2009.

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. **Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência**. In: Controle Biológico, eds. MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L., Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. v. 3, p. 163-200, 2000.

MONNERAT, R.G.; SANTOS, R.; BARROS, P.; BATISTA, A.; BERRY, C. **Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão**, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003, 4p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Comunicado técnico, 98).

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA, 2006. p.449-542.

NASERI, B.; FATHIPOUR, Y.; MOHARRAMIPOUR, S.; HOSSEININAVEH, V.; GATEHOUSE, A. M. Digestive proteolytic and amylolytic activities of *Helicoverpa*

armigera in response to feeding on different soybean cultivars. **Pest Management Science**, v. 66, n. 12, p. 1.316-1.323, 2010.

NEILANDS, J.B. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 45, 1995.

NEILANDS, J.B.; NAKAMURA, K. **Detection, determination, isolation, characterization and regulation of microbial iron chelates**. In: WINKELMANN, G. (Ed.). CRC handbook of microbial iron chelates. Florida: CRC Press, 1991. p.1-14.

NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. **Fertilidade o Solo**. 1ª. Ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. 1017p.

OLIVEIRA, A.L.M.; COSTA, K.R.; FERREIRA, D.C.; MILANI, K.M.L.; SANTOS, O.J.A.P.; SILVA, M.B.; ZULUANGA, Y.A. Biodiversity of soil bacteria and its applications for a sustainable agriculture. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.3, n.1, p. 56-77, 2014.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.207-220, 1996.

PEDGLEY, D. E. Windborne migration of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to the British Isles. **Entomologist's Gazette**, v. 36, n. 1, p. 15-20, 1985.

PIERRE, J.L.; FONTECAVE, M. Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry. **Biometals**, v.12, p. 195-199, 1999.

PIGOTT, C.R.; ELLAR, D.J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiol Mol Biol Ver**, v. 71, p.255–281, 2007.

PRAÇA, L.B.; GOMES, A.C.M.M.; CABRAL, G. MARTINS, E.S.; SUJII, E.R.; MONNERAT, R.G. Endophytic colonization by Brazilian strains of *Bacillus thuringiensis* on cabbage seedlings grown *in vitro*. **Bt Research**, v.3, n.3, p.11-19, 2012.

PROMDONKOY, B., ELLAR, D.J. Investigation of the pore forming mechanism of a Cytolytic d-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. **Biochem. J.** v. 374, p.255-259, 2003.

RABINOVITCH, L.; SILVA, C.M.B.; ALVES, R.S. de A. **Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus entomopatogênicos***. In: Controle Biológico, Eds. MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, v.2, p. 17-90, 2000.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p.319-339, 1999.

SAMPURNA, S.; MAITI, M. K. Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 9, p. 937-946, 2011.

SANTANA, F.S.C. ***Bacillus thuringiensis* como endofíticos em algodão: avaliação na promoção de crescimento e controle de *Spodoptera frugiperda***. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

SHARMA, A.; JOHRI, B.N. Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. **Microbiological Research**, v.158, p.243-248, 2003.

SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; CHANWAY, C.P. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v.29, p.191-196, 1999.

SOBERÓN, M.; FERNANDEZ, L.E.; PEREZ, C.; GILL, S.S.; BRAVO, A. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon*. v. 49, p. 597-600, 2007.

SPECHT, A.; SOSA-GOMEZ, D.R.; PAULA-MORAES, S.V.; YANO, S.A.C. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.6, p.689-692, 2013.

SRINIVASAN, R.; SU, F.; HUANG, C. Oviposition dynamics and larval development of *Helicoverpa armigera* on a highly preferred unusuitable host plant, *Solanum viarum*. **Entomologia Experimentalis et applicata**, v. 147, p. 217-224, 2013.

SRIVASTAVA, C. P.; NITIN, J.; TRIVEDI, T.P. Forecasting of *Helicoverpa armigera* populations and impact of climate change. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 80, n.1, p. 3-10, 2010.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 19. p.1-30, 2000.

SZENTES, S.; RADU, G.; LASLO, É.; LÁNYI, S.; MARA, G. Selection and evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from a raised bog environment. **Crop Protection**, v.52, p.116-124, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3a Ed. Artmed. Porto Alegre, 2006.

TANUJA, R.; BISHT, S.C.; MISHRA, P.K. Ascending migration of endophytic *Bacillus thuringiensis* and assessment of benefits to different legumes of N.W. Himalayas. **European Journal of Soil Biology**, v.56, p.56-64, 2013.

TSAVKELOVA, E. A.; KLIMOVA, S. YU.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV A. I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.42, n.2, p. 117–126, 2006.

VASSAL, J.M.; BREVAULT, T.; ACHALEKE, J.; MENOZZI, P. Genetic structure of the polyphagous pest *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) across the sub- Saharan cotton belt. **Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.** v.73, p.433-437, 2008.

VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

WANG, N.C.; LI, Z.H. Studies on the biology of cotton bollworm *Heliothis armigera* (Hübner) and *H. punctigera* Wallengren (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia: what do we know? **Australian Journal of Zoology**, Melbourne, v.34, n.6, p.779-814, 1986.

WANG. T.; LIU, M.; LI H. f **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science**. v. 64, 2014

WARREN, G. W. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests, p. 109–121. In: CAROZZI, N.; KOZIEL, M., Advances in insect control: the role of transgenic plants. **Taylor and Francis**, 1997.

WELLINGTON, B.; BORGES, M.T. Delivery methods for endophytic bacteria into maize, **Biocontrol**, v.49, p.315-322, 2004.

YU, C. G.; MULLINS, M. A.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G.; ESTRUCH, J. J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 532-536, 1997.

CAPÍTULO ÚNICO

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* TÓXICAS À *Helicoverpa armigera* E PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL

RESUMO

O estudo objetivou selecionar 100 estirpes de *Bacillus thuringiensis* com toxicidade para *Helicoverpa armigera* e potencial para promoção de crescimento vegetal. Das estirpes avaliadas 23 apresentaram 100% de mortalidade para *H. armigera*, sendo quinze pertencentes às subsp. *kurstaki* (S607, S845, S1258, S1264, S1450-HD1, S1905, S2122, S2124), *aizawai* (S616, S1295), *tolworthi* (S1304), *fokuokaensis* (S608), *sotto* (S615), *morrisoni* (S1301), *thuringiensis* (S1269) e oito estirpes sem subespécie identificadas. As estirpes apresentam perfil proteico de 130 e 65 kDa, sendo que algumas apresentaram apenas uma das proteínas e fragmentos de DNA de tamanho esperado para a detecção dos genes *cry1* e *cry2*. Na detecção da capacidade de promoção de crescimento *in vitro*, nenhuma estirpe apresentou a capacidade de produção de sideróforos, solubilização de fosfatos e fixação biológica de nitrogênio. Na produção de AIA todas as estirpes foram positivas e a quantidade variou de 1,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (estirpe S93) a 7,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (estirpe S1983). Das 100 estirpes analisadas 45 apresentaram amplicons esperados para todos os genes avaliados, sendo que 71 estirpes apresentaram amplicons de tamanhos esperados para o gene *fosfatase ácida*, 57 foram positivos para os genes *sideróforos*. Os genes envolvidos nas rotas de biossíntese do hormônio AIA se mostraram mais frequentes em estirpes de Bt, sendo que das estirpes analisadas 91 foram positivos para a presença do gene *ipdC*, 97 para o genes *iam1* e 93 para o gene *iam2*. *B. thuringiensis* pode ser utilizado no controle de *H. armigera* e possui potencial como inoculante para a promoção de crescimento vegetal, abrindo novas perspectivas para o uso agrônomico.

Palavras-chave: controle biológico, metabólitos secundários, diversidade genética.

ABSTRACT

This work to select 100 strain of *Bacillus thuringiensis* with toxicity to *Helicoverpa armigera* and potential for plant growth promotion. 23 strains showed 100% the mortality against *H. armigera*, of which fifteen belonged to subsp. *kurstaki* (S607, S845, S1258, S1264, S1450-HD1, S1905, S2122, S2124), *aizawai* (S616, S1295), *tolworthi* (S1304), *fokuokaensis* (S608), *sotto* (S615), *morrisoni* (S1301), *thuringiensis* (S1269) and eight without serotype. Some strains exhibited the profile of 130 and 65kDa, other showed just one of the proteins and the amplicons with the expected size of *cry1* and *cry2* gene. *In vitro* detection of growth promotion capability, showed that no strain had the siderophore production capability, phosphate solubilization and biological fixation of nitrogen. All strains tested were capable of produce IAA, and the amount varied from 1,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (S93 strain) to 7,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (1983 strain). 45 of the 100 analyzed strains showed the expected amplicons for all the studied genes, 71 strains showed the expected amplicon size for the *acid phosphatase* gene, 57 were positive for *siderophore* gene. The genes involved in the biosynthesis of IAA hormone were more frequent in Bt strains, 91 strains were positive for the presence of *ipdC* gene, 97 were positive for *iam1* gene, and 93 for *iam2* gene. *B. thuringiensis* can be used in biological control against *H. armigera* and has a great potential to promote plant growth, creating new perspectives for agronomic use.

Keywords: Biological control, secondary metabolite, genetic diversity.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se no cenário mundial pela importância da sua produção agrícola, que é baseada no modelo convencional, que emprega de forma intensiva, fertilizantes químicos e agrotóxicos, tornando o País um dos maiores consumidores mundiais.

Os insumos utilizados na agricultura brasileira são na sua maior parte importados, já que a indústria brasileira não acompanhou o crescimento agrícola. Com isso, os produtores ficam reféns da disponibilidade e dos preços praticados pelo mercado internacional, o que provoca uma insegurança econômica e aumento dos custos de produção.

As condições ambientais brasileiras juntamente com a melhoria da fertilidade dos solos, a irrigação e o desenvolvimento de variedades adaptadas, permitiram a produção em várias regiões e épocas do ano. Tal fato, entretanto possibilita aumento populacional de algumas espécies de insetos que assumem o papel de praga, o que é ainda mais acentuado por extensas áreas agrícolas com monocultivo.

Na safra 2012/2013, mas provavelmente com introdução anterior a essa data, foi registrada a ocorrência de *Helicoverpa armigera* em cultivos de algodão, soja, milho, tomate e citros, até então considerada uma praga quarentenária A1, mas que obteve o status de praga e causou perdas econômicas significativas em vários estados brasileiros, principalmente no oeste da Bahia. Espécie polífaga, tem preferência em se alimentar das estruturas reprodutivas das plantas, como flores, inflorescências, frutos e vagens. Todavia, também ataca brotos, folhas e caules.

O MAPA liberou em 2013, em caráter emergencial, na tentativa de reduzir os danos ocasionados pela *H. armigera*, diversos produtos fitossanitários, dentre eles o benzoato de emamectina, inseticida de classe toxicológica I, produto extremamente tóxico e altamente perigoso ao meio ambiente.

Porém, o uso intensivo e indiscriminado desses produtos impacta na elevação do custo de produção e podem degradar os recursos naturais, contaminar o solo, água, alimentos, flora e fauna, provocando desequilíbrios biológicos e ecológicos.

O desenvolvimento de novas abordagens, que venham a auxiliar a agricultura brasileira, mas que não impliquem na geração de mais dependência externa ou aumentem os já severos impactos ambientais pode ser realizada com a ampliação da oferta de insumos biológicos, como a tecnologia de inoculação com rizóbios na soja, rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR) e pelo uso de microrganismos no controle de insetos-pragas.

Neste contexto, o emprego de *Bacillus thuringiensis*, uma bactéria entomopatogênica a insetos de várias ordens e que também tem a capacidade de estimular o crescimento de plantas como já demonstrado em alface (GOMES *et al.*, 2014), leguminosas (TANUJA *et al.*, 2003), amendoim (WANG *et al.*, 2014) e ainda como inseticida sistêmico (PRAÇA *et al.*, 2012) pode vir a ser uma alternativa interessante.

O presente trabalho tem por objetivo selecionar estirpes de *B. thuringiensis*, que além de serem tóxicas à *H. armigera*, apresentem potencial para promover o crescimento vegetal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui desde 1987 uma Coleção de Bactérias de Invertebrados composta por 2583 estirpes de *Bacillus spp.*

Para a realização deste trabalho foram selecionadas 100 estirpes de *B. thuringiensis*. Algumas das estirpes escolhidas já possuíam subespécie identificada e apresentaram toxicidade a insetos da ordem Lepidoptera e outras foram avaliadas pela primeira vez.

A fim de avaliar a toxicidade destas estirpes de *B. thuringiensis* para lagartas de *H. armigera*, bioensaios seletivos foram realizados. As estirpes que apresentaram 100% mortalidade a este inseto foram caracterizadas molecular e bioquimicamente. As mesmas estirpes foram avaliadas também quanto à capacidade de produção de metabólitos secundários *in vitro* relacionados à promoção de crescimento vegetal e caracterizadas quanto à presença dos genes.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Brasília-DF.

2.1 Determinação da toxicidade de *B. thuringiensis* à *H. armigera*

2.1.1 Criação massal de *Helicoverpa armigera*

A criação massal de *H. armigera* foi estabelecida no Laboratório de Cultura de Plantas e Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Para isso, os ovos foram gentilmente cedidos pela Embrapa Hortaliças.

Após a eclosão, lagartas neonatas foram individualizadas em copos plásticos de 30 mL com tampa contendo dieta artificial para *Anticarsia gemmatalis* descrita por Greene *et al.* (1976) com modificações, onde permaneceram até atingirem a fase de pupa.

Para o preparo da dieta, todos os ingredientes autoclaváveis (Tabela 1) foram colocados em um Becker de 2000 mL e misturados até ficar homogêneo. O Becker foi fechado com o papel alumínio e autoclavado por 20 minutos a 120 °C / 1 atm.

Tabela 1– Ingredientes autoclaváveis para a dieta artificial para alimentação das lagartas de *H. armigera*

Ingredientes	Quantidade
Feijão branco triturado	75 g
Levedo de cerveja	37,5 g
Germén de trigo	60 g
Proteína de soja triturada	30 g
Leite em pó	30 g
Ágar	30 g
Água destilada	1200 mL

Após a autoclavagem e com a dieta na temperatura de 60°C foram acrescentados os ingredientes não autoclaváveis (Tabela 2), sendo homogeneizada e vertida em um pote plástico com capacidade de 2 L.

Tabela 2 – Ingredientes não autoclaváveis para a dieta artificial para alimentação das lagartas de *H. armigera*

Ingredientes	Quantidade
Ácido ascórbico	3,6 g
Ácido sórbico	1,8 g
Nipagim (Metil Parabeno)	3 g
Solução vitamínica*	9 mL
Formol 40%	3,6 mL

*Composição da solução vitamínica: 12 g ácido ascórbico; 0,15 g niacina, 0,30 g pantotenato de cálcio, 0,040 g Tiamina HCl, 0,080 g Riboflavina, 0,040 g Piridoxina, 0,080 g de ácido fólico. Misturar todos os componentes em 1000 mL de água destilada estéril e armazenar em geladeira.

O recipiente contendo a dieta foi então deixado sob luz ultra-violeta por 20 minutos, sendo posteriormente fechado e armazenado a 8 °C. Nas condições de preparo e armazenamento ideais a dieta tem uma validade de 40 dias.

As pupas foram retiradas dos potes e sexadas de acordo com a metodologia de Butt & Cantu (1962), sendo posteriormente desinfetadas com uma solução de formol 5% por 5 minutos, água destilada por 2 minutos e sulfato de cobre 1% por 2 minutos, colocadas para secar em papel toalha. As pupas sexadas foram distribuídas de 10 em 10 em potes plásticos de 200 mL com tampa para emergirem separadamente (Figura 2).



Figura 2 – Pupas de fêmeas e de machos de *H. armigera*.

Trinta casais de adultos recém-emergidos foram colocados em gaiolas de polietileno de 50x30x30 cm (Figura 3) e alimentados com algodão embedido na dieta líquida (75% de dieta líquida (Tabela 3) e 25% de cerveja sem álcool) dentro de copos plásticos de 50 mL. Para aumentar a umidade e favorecer a cópula foram colocados três copos plásticos de 50 mL contendo algodão molhado com água destilada.



Figura 3 - Gaiola de adultos de *H. armigera*.

Tabela 3 - Dieta líquida para alimentação dos adultos de *H. armigera*

Ingredientes	Quantidade
Mel	10 g
Ácido sórbico	1 g
Nipagim (Metil Parabeno)	1 g
Açúcar	60 g
Água destilada	1000 mL

A dieta líquida após completamente dissolvida pode ser armazenada a 8 °C. A cerveja sem álcool foi colocada apenas no momento de ser colocada dentro da gaiola.

Para a oviposição foram colocados pedaços de barbantes de algodão desfiados pendurados na parte superior e papel toalha na base da gaiola. A cada dois dias foi montada uma nova gaiola, sendo os adultos vivos cuidadosamente transferidos e os barbantes com posturas (Figura 4) retirados e colocados em potes plásticos de 250 mL com tampa sem dieta artificial.



Figura 4 - Barbante de algodão perdurado na parte superior da gaiola para realização das posturas de *H. armigera*.

A eclosão das lagartas iniciou após três dias após a postura e foram cuidadosamente individualizadas para copos plásticos contendo dieta artificial. Por serem canibais o repique deve ser realizado um ou dois dias após a eclosão das lagartas (Figura 5).



Figura 5 - Lagartas de *H. armigera* individualizadas em copos plásticos com tampa contendo dieta artificial.

Os adultos foram mantidos em salas separadas das lagartas. As condições das salas eram de umidade média de 60%, temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, fotoperíodo de 14/10 horas.

A confirmação da espécie *H. armigera* foi realizada utilizando a metodologia de Behere *et al.* (2008).

2.1.2 Cultivo das estirpes de *Bacillus thuringiensis*

As estirpes de *B. thuringiensis* foram cultivadas em meio Embrapa (MONNERAT *et al.*, 2007) a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 horas sob agitação contínua de 200 rpm até sua completa esporulação. Para verificar a pureza e o crescimento, uma gota do cultivo final de cada estirpe foi analisada em microscópio óptico de contraste de fases com aumento de 1000X para observação de esporos e cristais, sendo então, o cultivo final, utilizadas para a realização do bioensaio seletivo, caracterização bioquímica e ensaio bioquímico de promoção de crescimento vegetal.

2.1.3 Bioensaio seletivo

O bioensaio seletivo consistiu na busca de estirpes que tenham potencial para o controle de 100% das lagartas de *H. armigera*.

Para a realização dos bioensaios 35 μL do cultivo final foi adicionado na dieta dos insetos previamente distribuída em placas de cultivo de células com 24 poços (Figura 6). Após a absorção da cultura pela dieta nas placas, uma lagarta neonata foi colocada em cada

poço. Para cada estirpe foi utilizado uma placa e uma sem adição da bactéria foi utilizada como testemunha.



Figura 6 - Placa de cultura de células com 24 poços com dieta artificial de *H. armigera*.

O ensaio foi mantido nas mesmas condições da criação massal. A primeira avaliação da mortalidade foi realizada 48 horas após o início do ensaio, quando as lagartas sobreviventes foram transferidas para copos plásticos (30 mL) com tampa contendo dieta livre do patógeno. No sétimo dia após o início do ensaio foi realizada a segunda e última avaliação (MONNERAT *et al.*, 2001; SILVA-WERNECK & MONNERAT, 2001). Ao final foi determinado o número de lagartas mortas nas três repetições determinando-se a porcentagem de mortalidade. Os bioensaios foram realizados em triplicata.

2.1.4 Caracterização bioquímica

A caracterização do perfil protéico das estirpes que apresentaram 100% de mortalidade para as lagartas de *H. armigera* foi analisado de acordo com o protocolo de extração de proteínas descrito por Lecadet *et al.*, (1991) com modificações.

As culturas bacterianas foram transferidas na quantidade de 1,5 mL para tubos de polipropileno de 1,5 mL estéreis e, em seguida centrifugadas a 14000 rpm (Jouan BR4i – França), por 15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e o procedimento repetido por mais duas vezes para a obtenção do sedimento. Após a terceira centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e o sedimento lavado com 1,5 mL de NaCl 5M e centrifugado por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as paredes do tubo foram secas com papel filtro. Os sedimentos foram lavados por três vezes com 1,5 mL com uma solução

de EDTA 100 mM e PMSF 1 mM e centrifugados por 15 minutos. Ao final o sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo o complexo esporo-cristal foi ressuspensão em 300 µL da solução de EDTA 100 mM e PMSF 1 mM e armazenados a -20 °C.

As análises dos perfis protéicos das estirpes foram realizadas conforme procedimento descrito por Laemmli (1970), através da eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS a 10% (SDS-PAGE). Alíquotas de 20 µL das preparações de esporo-cristal foram diluídas em 8 µL de tampão de amostra de proteína 4X (250 mM Tris-HCl, pH 6,8, 40% Glicerol, 0,14 mM SDS, 10% β-Mercaptoetanol, 0,1% Azul de Bromofenol) fervidas a 100 °C por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10%. Foi utilizado 5 µL de marcador de proteína (marcador de massa molecular Rainbow da GE). A eletroforese foi realizada em um aparelho de eletroforese vertical (Biorad), contendo tampão de corrida 1X (Tris-base, glicina, SDS 10%) a voltagem constante de 120 V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. O gel foi corado com 20 mL de solução corante de Comassie blue (40% metanol e 25% Comassie blue 250-R) por 12 horas e descorado com 20 mL de solução descorante (40% de metanol, 10% ácido acético e 50% água destilada) até a visualização dos perfis protéicos das estirpes.

2.1.5 Caracterização molecular dos genes *cry*

As estirpes que apresentaram 100% de mortalidade para as lagartas de *H. armigera* foram caracterizadas quanto à presença de genes *cry*.

O DNA das estirpes de Bt foi extraído utilizando a metodologia descrita por Bravo *et al.* (1998). Para tal, as estirpes foram cultivadas em meio Ágar Embrapa (MONNERAT *et al.*, 2007) a 30 °C por 16 horas. Após o crescimento, uma alça (usando se alça de platina - Ø: 0,5 mm) da bactéria cultivada foi colocada em 100 µL de água destilada estéril em um micro tubo. Após serem vigorosamente homogeneizadas em homogeneizador tipo “vortex”, as amostras foram congeladas por uma hora a -20 °C, em seguida, fervidas a 100 °C por 10 minutos e resfriadas em gelo por 2 minutos. Após este procedimento as amostras foram centrifugadas 14.000 rpm por 2 minutos (Jouan BR4i – França) e o sobrenadante cuidadosamente transferido sem o sedimento para um tubo novo estéril.

Os iniciadores usados para cada reação estão descritos na tabela 3. O programa de PCR utilizado para a amplificação foi de 94 °C / 5min, 30 ciclos de 94 °C / 1 min, anelamento (vide temperatura de anelamento, Tabela 4), 72 °C / 1 min e 30 s, bem como uma extensão final de 72 °C / 5 min. Para a realização dos PCRs foi preparado um Mix que consiste em 0,6 µL de dNTP mix (10 mM), 1,0 µL de cada iniciador (10 µM), 2,5 U de Taq DNA polimerase

e 5 µL do sobrenadante em um volume total de 30 µL. Foram utilizados oligonucleotídeos para a identificação dos seguintes genes: *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry10*, *cry11*, *cry12*, *cry13*, *cry14*, *cry17*, *cry19*, *cry21*, *cry24*, *cry25*, *cry27*, *cry29*, *cry30*, *cry32*, *cry39*, *cry40* (CERON *et al.*, 1995; BRAVO *et al.*, 1998; IBARRA *et al.*, 2003).

Tabela 4 - Características dos iniciadores utilizados para a detecção dos genes *cry* em estirpes de *B. thuringiensis*

Oligos	Sequência	Genes	Bandas de DNA (pb)	Cristal Protéico (kDa)	Tm (°C)
cry1 Ceron <i>et al.</i> , 1995	5'TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA3' (d) ¹ 5'TATCGGTTTCTGGGAAGTA3' (r) ²	<i>cryIAa</i>	272	133	48
		<i>cryIAb</i>	284	130	
		<i>cryIAc</i>	272	133	
		<i>cryIB</i>	290	140	
		<i>cryIC</i> , <i>cryID</i>	284	132-134	
		<i>cryIEa</i>	275	133	
		<i>cryIEb</i>	290	133	
		<i>cryIFa</i>	284	132-134	
cry1 Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA3' (d) 5'TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA 3' (r)	<i>cryIAa</i>	246	133	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'CAGCCGATTTACCTTCTA 3' (d) 5'TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA3' (r)	<i>cryIAd</i>	171	133	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'GTTAGATTAATAGTAGTGG 3' (d) 5'TGTAGGTGGTACTGTTATTG 3' (r)	<i>cryIAc</i>	180	133	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'AACAACCTATCTGTTCTTGAC3' (d) 5'CTCTTATTATACTTACTACTAC3' (r)	<i>cryIAb</i>	216	130	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'CTTCATCACGATGGAGTAA3' (d) 5'CATAATTTGGTCGTTCTGTT3' (r)	<i>cryIB</i>	367	140	53

continuação Tabela 4 - Características dos iniciadores utilizados para a detecção dos genes *cry* em estirpes de *B. thuringiensis*

Oligos	Sequência	Genes	Bandas de DNA (pb)	Cristal Protéico (kDa)	Tm (°C)
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'AAAGATCTGGAACACCTTT 3' (d) 5'CAAACCTCTAAATCCTTTCAC 3' (r)	cry1C	130	134	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'CTGCAGCAAGCTATCCAA3' (d) 5'ATTTCAATTGTCAAGGCCTG3' (r)	<i>cry1D</i>	290	132	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'GTATAAGTGGAGGGATCCATATG3' (d) 5'GGATCCCTACATGTTACGCTT3' (r)	<i>cryII</i>	2100	72	54
cry2 Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'GAGTTTAATCGACAAGTAGATAATTT3' (d) 5'GGAAAAGAGAATATAAAAATGGCCAG3' (r)	<i>cry2</i>	526	72	51
cry3 Ceron <i>et al.</i> , 1995	5'TTAACCGTTTTTCGCAGAGA3' (d) 5'TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG3' (r)	<i>cry3A</i> <i>cry3B</i> <i>cry3C</i> <i>cry3Cb</i> <i>cry3Cc</i> <i>cry3D</i> <i>cry3F</i> <i>cry3G</i>	703 709 694 718 652 733	73	48
cry4 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'CGTTTTCAAGACCTAATAATATAATACC3' (d) 5'CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT3' (r)	<i>cry4B</i>	321	72	50
cry5+12+ 14+21 Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'TTCGTAAATTGGTCAATCAAGCAA3' (d) 5'AAGACCAAATTCAATACCAGGGTT3' (r)	<i>cry5Aa</i> , <i>cry5Ab</i> , <i>cry5Ac</i> , <i>cry5B</i> <i>cry12</i> <i>cry14</i> <i>cry21</i>	474 477 483 489	152-142 135-140 142 132	50
cry8 Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'ATGAGTCCAAATAATCTAAATG 3' (d) 5'TTTGATTGAATGAGTTCTTCCACTC3' (r)	<i>cry8A</i> <i>cry8B</i> <i>cry8C</i>	 376	131 134 130	49

continuação Tabela 4 - Características dos iniciadores utilizados para a detecção dos genes *cry* em estirpes de *B. thuringiensis*

Oligos	Sequência	Genes	Bandas de DNA (pb)	Cristal Protéico (kDa)	Tm (°C)
cry9 esp. Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'GTTGATACCCGAGGCACA3' (d) 5'CCGCTTCCAATAACATCTTTT3' (r)	<i>cry9A</i>	571	130	51
cry9 esp. Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'TCATTGGTATAAGAGTTGGTGATAGCA 3' (d) 5'CCGCTTCCAATAACATCTTTT3' (r)	<i>cry9B</i>	402	130	51
cry9 esp. Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'CTGGTCCGTTCAATCC3' (d) 5'CCGCTTCCAATAACATCTTTT3' (r)	<i>cry9C</i>	306	130	51
cry10 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'TCAATGCTCCATCCAATG3' (d) 5'CTTGTATAGGCCTTCTCCG3' (r)	<i>cry10</i>	348	78	51
cry11 Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC3' (d) 5'CATTCTACTTGAAGTTGTTAATCCC3' (r)	<i>cry11A</i> <i>cry11B</i>	305	72 81-84	50
cry13 Bravo <i>et al.</i> , 1998	5'CTTTGATTATTTAGGTTTAGTTCAA3' (d) 5'TTGTAGTACAGGCTTGTGATTC3' (r)	<i>cry13</i>	313	88	50
cry17+27 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'CATTGTTCTACTTGGTATAA3' (d) 5'GATACAATTACATCTCCTCCTGTA 3' (r)	<i>cry17</i> <i>cry27</i>	832 895	72	47
cry25 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'GGCTTCTAGATCAGGAGATGG3' (d) 5'CATCATAATCAGAGCGCAGG 3' (r)	<i>cry25</i>	560	76	53
cry19+39 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'AAGCTGCGAATCTGCATTTACTTTT3' (b) 5'CTCATAATTTTCCGTCCATAAAT 3' (r)	<i>cry19Aa</i> <i>cry19Ba</i> <i>cry39</i>	616 631 619	75	51
cry24+40 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'TTATCAATGTTAAGGGATGC3' (d) 5'ACTGGATCTGTGTATATTTTCCTAG3' (r)	<i>cry24Aa</i> <i>cry40Aa</i>	304 366	76	48

continuação Tabela 4 - Características dos iniciadores utilizados para a detecção dos genes *cry* em estirpes de *B. thuringiensis*

Oligos	Sequência	Genes	Bandas de DNA	Cristal Protéico	Tm (°C)
cry29 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'TCAGCTCCAATAACTGGTG 3' (d) 5'GCATGTCATCCCCTTGTCTA3' (r)	<i>cry29</i>	451	74,4	50
cry30 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'AACTCACACATCCTCCATCG3' (d) 5'ATCGAAGGCAATCATTCG3' (r)	<i>cry30</i>	265	77,8	50
cry30 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5'TGGTCGGGAGAGAATGGATGGA3' (d) 5'ATGTTTGCACACCATTTTC 3' (r)	<i>cry32Aa</i> <i>cry32Ba</i> <i>cry32Ca</i> <i>cry32D</i>	677 676	82	54

2.2 Determinação da capacidade de promoção de crescimento por estirpes de *B. thuringiensis*

2.2.1 Detecção da produção de sideróforos

A metodologia utilizada foi a descrita por Cattelan (1999). Cem microlitros do cultivo final foram utilizados para inocular 10 mL de meio TSL 10 vezes diluído em erlenmeyer de 50 mL e, mantido sob agitação contínua de 200 rpm a 28°C por 72 horas. As culturas bacterianas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos (Jouan BR4i – França).

Posteriormente, a uma mL do sobrenadante foi adicionado uma mL da solução indicadora de Cromo Azurol S (CAS). Foram consideradas positivas as estirpes em que foi observada a mudança de coloração da mistura de azul para amarelo-alaranjado em 15 minutos, sendo o ensaio realizado em triplicata.

2.2.2 Detecção e quantificação da produção de ácido indol-acético (AIA)

Foram utilizados 100 µL do cultivo final dos isolados para inocular 15 mL de meio DYGS em erlenmeyer de 50 mL (RODRIGUES NETO *et al.*, 1986) suplementado com L-triptofano na concentração final de 600 µg mL⁻¹. Estes foram colocados sob agitação contínua de 200 rpm a 28°C por 72 horas. Posteriormente, a cultura bacteriana foi centrifugada a 10.000 rpm por 3 minutos (Jouan BR4i – França).

A produção de AIA foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Gordon & Weber (1950) onde 500 µL do sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio pequenos e adicionado 1 mL do reagente de Salkowski (1 ml de 0,5 M FeCl₃ em 50 ml de ácido perclórico 35%) previamente preparado. As análises foram realizadas em triplicata e as amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente para posterior leitura.

A leitura da absorbância foi realizada em equipamento Picodrop Spectrometer (Pico100 – Inglaterra) com um comprimento de onda de 530 nm. A quantificação de AIA foi avaliada utilizando uma curva de calibração de AIA sintético (Sigma) nas concentrações de 0; 1; 2,5; 5; 7,5 e 10 µg mL⁻¹.

2.2.3 Detecção da solubilização de fosfato inorgânico

A capacidade de solubilização de fosfato foi avaliada utilizando-se a metodologia descrita por Sylvester-Bradley *et al.* (1982). Foi utilizado o meio GY autoclavado que ao atingir uma temperatura próxima a 50°C, foi adicionado 50 mL de K₂HPO₄ (10%) e 100 mL de CaCl₂ (10%) também autoclavados para a formação de precipitado insolúvel de CaHPO₄ e em seguida o meio de cultura foi distribuído em placas de Petri. Vinte microlitros do cultivo final de cada isolado foram utilizados para a inoculação em um ponto do meio de cultura.

As placas foram mantidas no escuro em estufa de crescimento por 7 dias a 30°C. A avaliação foi visual sendo considerado solubilizadores as estirpes que formaram um halo transparente no meio de cultura originalmente opaco. O ensaio foi realizado em triplicata.

2.2.4 Detecção da capacidade de fixação assimbiótica de nitrogênio

Para avaliar a capacidade de fixação biológica de nitrogênio 100 µL de cada estirpe do cultivo final foram utilizados como inóculo em tudo de ensaio contendo 5 mL de meio TBNR semi-sólido isento de nitrogênio (SELDIN *et al.*, 1984). As estirpes foram incubadas por sete dias a 30°C em estufa de crescimento, sendo o ensaio realizado em triplicata. Foram consideradas fixadoras as estirpes que se desenvolveram formando uma película interior do meio.

2.2.5 Detecção de genes relacionados ao metabolismo de crescimento vegetal.

As estirpes de *B. thuringiensis* selecionadas para os ensaios *in vitro* quanto à presença de metabólitos secundários relacionados ao crescimento vegetal, foram caracterizadas via PCR para detecção dos genes da fosfatase ácida (metabolismo de solubilização de fosfato); sideróforos (capacidade de produzir complexos com ferro) e *iam1*, *iam2* e *ipdC* (produção de ácido indol-acético).

Os iniciadores e a temperatura de anelamento usados estão descritos na tabela 5. O DNA foi extraído e os programas de PCR utilizados foram realizados conforme descrito no item 2.1.5.

Tabela 5 - Característica dos iniciadores utilizados para detecção dos genes *fosfatase ácida* (metabolismo de solubilização de fosfato); *sideróforos* (capacidade de produzir complexos com ferro) e *iam1*, *iam2* e *ipdC* (produção de ácido indol-acético) em estirpes de *B. thuringiensis*

Gene alvo	Sequência dos iniciadores (5' → 3')*	Tm (°C)	Nome do iniciador	Tamanho esperado do fragmento amplificado	Referência
Biossíntese de proteínas Sideróforos	GAGAATGGATTACAGAGGAT (d)	55,5	Sider-F	1730pb	Raddadi <i>et al.</i> , 2008.
	TTATGAACGAACAGCCACTT (r)		Sider-R		
Fosfatase ácida (solubilização de fosfato)	AAGAGGGGCATTACCACTTTATTA (d)	55,5	AcPho-F	734pb	Raddadi <i>et al.</i> , 2008.
	CGCCTTCCCAATCRCCATAAT (r)		AcPho-R		
Triptofano 2-monooxigenase (Auxina)	GTGACAGCTTTCTATCGRAA (d)	55	IAM 1-F	220pb	*
	GTCCTTGTCTTCCCAAATC (r)		IAM 1-R		
Triptofano 2-monooxigenase (Auxina)	GGAACATCTTTTAGCTGGAGT (d)	55	IAM 2-F	191pb	*
	TATGCAACTCTTACTCCAGAC (r)		IAM 2-R		
Indole piruvato descarboxilase (auxina)	GGATAAAATGCTWCTACATGCC (d)	55,5	ipdC-F	350pb	*
	CAGTGTAGGGATGRATTTWCWAT (r)		ipdC-R		

* Nos iniciadores degenerados, a sequência é dada de acordo com código para DNA degenerado: K = G ou T; M = A ou C; W = T ou A; Y = C ou T; N = A, C, G ou T; R = A ou G. Iniciadores desenhados.

2.2.5.1 Desenho dos iniciadores

Apesar de já existir um iniciador para detecção do gene *ipdC* correlato a produção de auxina (RADDADI *et al.*, 2008), fez-se necessário a construção dos genes *iam* e *ipdC*, tendo em vista que a produção de auxina pode ser originada de duas vias distintas (Figura 7).

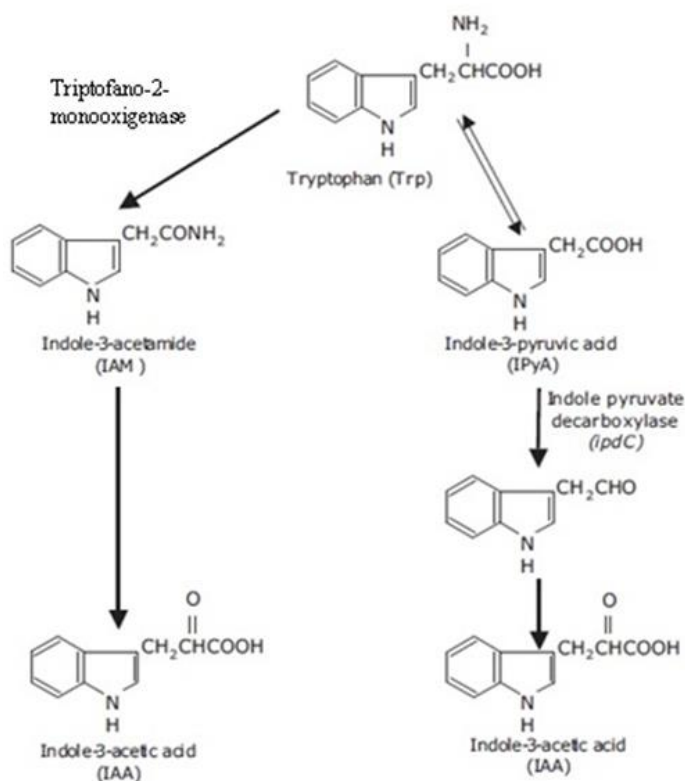


Figura 7 - Vias dependentes de triptofano para biossíntese de AIA (adaptado de Raddadi *et al.*, 2008).

Os iniciadores específicos para a amplificação dos genes alvos foram desenhados com o auxílio do programa Vector NTI Advance 10 (Invitrogen). Foram desenhados para anelar internamente na sequência do gene alvo, de acordo com as sequências depositadas no GenBank (NCBI, 2012) (Tabela 6).

Tabela 6- Característica dos iniciadores desenhados para a detecção dos genes *iam1*, *iam2* e *ipdC* em estirpes de *B. thuringiensis*

Gene alvo	Sequência dos iniciadores (5' → 3')*	Tm (°C)	Nome do iniciador	Número de acesso ao Genbank das sequências utilizadas
Triptofano 2- monooxigenase	GTGACAGCTTTCTATCGRAA (d)	55	Iaam 1	NC_020376.1 (1999427-2000890)
	GTCCTTGTTCTTCCCAAATC (r)			NC_016779.1 (1876211-1877674)
Triptofano 2- monooxigenase	GGAACATCTTTTAGCTGGAGT (d)	55	Iaam 2	NC_020376.1 (1908949-1901385)
	TATGCAACTCTTACTCCAGAC (r)			NC_016779.1 (1787162-1788598)
Indole piruvato descarboxilase	GGATAAAATGCTWCTACATGCC (d) CAGTGTAGGGATGRATTCWAT (r)	55,5	IpdC	NC_017200.1 (2484577-2486253)
				NC_005957.1 (2363214-2364899)
				NC_029238.1 (2576894-2578570)
				NC_016771.1 (2369127-2370812)
				NC_006274.1 (2361116-2362801)
				NC_018491.1 (4403919-4405595)
				NC_003909.8 (2399931-2401616)
				NC_014171.1 (2326979-2328655)
NC_018693.1 (1645667-1647343)				
NC_017208.1 (2404832-2406508)				

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Criação massal de *Helicoverpa armigera*

A identificação e a confirmação de que os insetos utilizados na criação massal eram *H. armigera* foi de extrema importância já que cada espécie possui diferente suscetibilidade às toxinas de Bt.

O perfil RLFP-PCR obtido foi semelhante ao encontrado por Behere *et al.* (2008). Utilizando-se os iniciadores para o gene *citocromo oxidase subunidade I* (COI) obteve-se um fragmento de amplificação de 511 pb e seguindo-se a digestão desse fragmento com a enzima de restrição BstZ17I, obteve-se um perfil de restrição com fragmentos de 318 pb e 193 pb e outro de 511 pb (Figura 8). O teste molecular confirmou que a criação massal estabelecida e os estudos realizados neste trabalho foram para a espécie *H. armigera*.

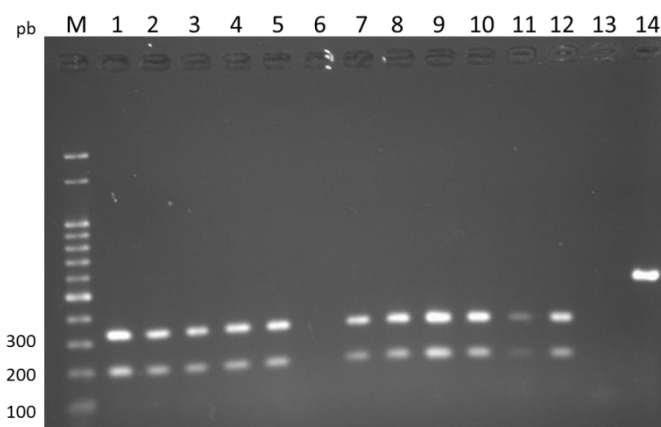


Figura 8 - Padrão de RFLP-PCR digerido com a enzima BstZ17I. Eletroforese em gel de agarose a 1,0%, mostrando em M, marcador 100 pb da Ludwing; 1-5 e 7-12 produto de amplificação correspondente para *H. armigera*; 14: produto de amplificação correspondente para *H. zea*.

As lagartas de *H. armigera* eclodiram e cresceram nas condições de temperatura, umidade relativa do ar e fotoperíodo utilizado neste trabalho.

As fêmeas realizavam a maioria das posturas nos barbantes de algodão (Figura 9) e um pouco no papel toalha colocada no fundo da gaiola.

De acordo com Mensah (1996), as fêmeas procuram ovipositar na face adaxial das folhas ou sobre talos, flores, frutos e brotações terminais com superfícies pubescentes. Como

o barbante imitava uma superfície pubescente, isso pode explicar a preferência pela oviposição.



Figura 9 - Barbante de algodão com ovos de *H. armigera*.

O período de incubação dos ovos foi de 3 a 4 dias corroborando com Ali & Choudhry (2009). O período larval durou aproximadamente 20 dias e a coloração variou de verde ao amarelo claro, marrom, avermelhado ou preto, cápsula cefálica de cor parda clara e linhas finas brancas laterais (Figura 10), como descrito por Czepak *et al.* (2013).



Figura 10 - Lagartas de *H. armigera* de diferentes colorações.

As pupas apresentaram coloração marrom-mogno e superfície arredondada nas partes terminais como descrito por Ali & Choudhry (2009). O período de pupa durou aproximadamente 10 dias.

As fêmeas têm o primeiro par de asas de cor marrom alaranjado ao passo que os machos têm seu primeiro par de asas de cor cinza esverdeado (CZEPAK *et al.*, 2013), características encontradas nos adultos da criação, podendo ser verificado na Figura 11.



Figura 11 - Mariposas de *H. armigera* – fêmea (esquerda) e macho (direita).

A metodologia de criação desenvolvida permitiu a obtenção de indivíduos saídos de *H. armigera* em quantidade suficiente para a realização dos bioensaios com *B. thuringiensis*.

3.2 Bioensaio seletivo

Dentre as 100 estirpes testadas, 23 apresentaram 100% de mortalidade contra lagartas de *H. armigera*. Pode-se observar que quinze estirpes tóxicas foram pertencentes aos sorotipos *kurstaki* (S607, S845, S1258, S1264, S1450-HD1, S1905, S2122, S2124), *aizawai* (S616, S1295), *tolworthi* (S1304), *fokuokaensis* (S608), *sotto* (S615), *morrisoni* (S1301), *thuringiensis* (S1269) e oito estirpes sem subespécie identificadas.

As outras 77 estirpes apresentaram mortalidade inferior a 100%. A testemunha apresentou apenas 10% de mortalidade.

Estirpes pertencentes ao sorotipo *kurstaki* são consideradas as mais tóxicas para insetos da ordem Lepidoptera (AZZOUZ *et al.*, 2014), porém as estirpes pertencentes ao

sorotipo *morrisoni* (MACEDO *et al.*, 2012; APAYDIN *et al.*, 2008), *aizawai* (SHOJAADDINI *et al.*, 2012), *sotto* (GUERCHICOFF *et al.*, 2001), *fokuokaensis* (MELATTI *et al.*, 2005) e *thuringiensis* (JAQUET *et al.*, 1987), também apresentam alta atividade inseticida contra insetos lepidópteros, corroborando os resultados encontrados neste trabalho.

Entretanto as estirpes pertencentes aos sorotipos *alesti*, *darmstadiensis*, *entomocidus*, *galleriae*, *japonensis*, *israelensis*, *kumomatoensis*, *kenyae*, *muju* não apresentaram 100% de mortalidade.

B. thuringiensis subsp. *israelensis* possui atividade tóxica para diversos insetos da ordem Diptera (MONNERAT *et al.*, 2006; BERRY *et al.*, 2002). A subespécie *darmstadiensis* não foi tóxica quanto testada contra lagartas de *Pieris brassicae* e *Heliothis virescens*, porém foi tóxica para *Spodoptera littoralis*. Já a subespécie *kenyae* é toxica para *H. virescens* e não é tóxica para *S. littoralis* (JAQUET *et al.*, 1987). Macedo *et al.* (2012), verificou que a subespécie *galleriae* possui toxicidade contra *Diatraea saccharalis* o que não foi observado nesse trabalho para *H. armigera*.

Os resultados da média de mortalidade de todas as estirpes pode ser visualizado na tabela 7.

Tabela 7 – Resultados de bioensaio seletivo contra *H. armigera*

Estirpes	Sorotipo	Mortalidade (%)	Estirpes	Sorotipo	Mortalidade (%)
S29	Ns	51,5	S1258	<i>Kurstaki</i>	100
S40	Ns	75	S1261	Ns	100
S62	<i>Tolworthi</i>	71	S1262	<i>ostriniae</i>	71
S93	Ns	100	S1264	<i>kurstaki</i>	100
S165	<i>Israelensis</i>	62,5	S1269	<i>thuringiensis</i>	100
S202	<i>Tochigiensis</i>	21	S1271	<i>alesti</i>	33
S392	Ns	37,5	S1272	Ns	62,5
S406	Ns	50	S1275	Ns	54
S407	Ns	46	S1285	Ns	50
S408	Ns	37	S1286	Ns	80
S411	Ns	71	S1287	Ns	100
S456	<i>Entomocidus</i>	37	S1288	<i>israelensis</i>	58
S459	<i>Tolworthi</i>	25	S1289	Ns	100
S467	Ns	80	S1290	Ns	92

(Ns) não sorotipadas

continuação Tabela 7 - Resultados de bioensaio seletivo contra *H. armigera*

Estirpes	Sorotipo	Mortalidade (%)	Estirpes	Sorotipo	Mortalidade (%)
S490	Ns	71	S1291	<i>israelensis</i>	25
S511	Ns	71	S1292	<i>israelensis</i>	37,5
S550	<i>Kurstaki</i>	75	S1295	<i>aizawai</i>	100
S597	<i>Galleriae</i>	42	S1301	<i>morrisoni</i>	100
S599	<i>Kenya</i>	79	S1304	<i>tolworthi</i>	100
S601	Ns	100	S1307	Ns	100
S602	Ns	75	S1342	Ns	50
S607	<i>Kurstaki</i>	100	S1365	<i>pakistani</i>	71
S608	<i>Fokuokaensis</i>	100	S1450 HD-1	<i>kurstaki</i>	100
S612	<i>Darmstadiensis</i>	33	S1457	<i>kumomatoensis</i>	92
S615	<i>Sotto</i>	100	S1530	Ns	29
S616	<i>Aizawai</i>	100	S1704	Ns	12
S617	<i>Kenya</i>	64,5	S1806	<i>israelensis</i>	50
S655	<i>Alesti</i>	21	S1905	<i>kurstaki</i>	100
S700	<i>Ostrinae</i>	29	S1974	Ns	79
S711	<i>Japonensis</i>	33	S1975	Ns	79
S728	<i>Thuringiensis</i>	33	S1976	Ns	37
S755	Ns	42	S1977	Ns	46
S763	Ns	50	S1978	Ns	50
S764	<i>Kurstaki</i>	48	S1979	Ns	100
S844	Ns	54	S1982	Ns	58
S845	<i>Kurstaki</i>	100	S1983	Ns	46
S907	Ns	54	S1984	Ns	62
S1026	Ns	37	S1985	Ns	54
S1067	Ns	71	S1986	Ns	33
S1089	Ns	58	S1989	Ns	58
S1092	Ns	67	S1990	Ns	37
S1094	Ns	54	S1995	Ns	67
S1166	<i>Muju</i>	75	S2001	Ns	87
S1167	<i>Darmstadiensis</i>	54	S2004	Ns	71
S1179	Ns	62,5	S2005	Ns	96
S1185	<i>Entomocidus</i>	46	S2006	Ns	58
S1191	Ns	100	S2007	Ns	58
S1192	<i>Sotto</i>	50	S2021	Ns	42
S1225	Ns	33	S2122	<i>kurstaki</i>	100
S1257	Ns	46	S2124	<i>kurstaki</i>	100

(Ns) não sorotipadas

Os produtos existentes no mercado são a maioria formulações baseadas nas estirpes *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (HARRISON & BONNING, 2000), *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e *B. thuringiensis* subsp. *azawai* (BRAVO *et al.*, 2011).

Este trabalho mostrou que lagartas de *H. armigera* são altamente susceptíveis a outras subespécies de *B. thuringiensis* além das presentes nos produtos biológicos já disponíveis no mercado, aumentando assim as possibilidades de controle e diminuindo o risco de selecionar insetos resistentes às toxinas de *B. thuringiensis*.

3.3 Caracterização bioquímica e molecular de genes *cry* das estirpes de *B. thuringiensis*

Foram caracterizadas de acordo com o seu perfil protéico e genes *cry* das 23 estirpes que apresentaram 100% de mortalidade à *H. armigera*.

Por meio da análise da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE-10%) da mistura de esporos-cristais (Figura 12), foi possível observar que 10 estirpes eram compostas de dois polipeptídios principais de aproximadamente 130 e 65 kDa semelhantes entre si e ao perfil do padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (HOFTE e WHITELEY, 1989). As outras estirpes apresentaram apenas a presença de um desses polipeptídios, sendo que 9 estirpes apresentaram apenas a proteína de 130 kDa e as S93, S608 e S1289 apresentaram apenas a proteína de 65 kDa.

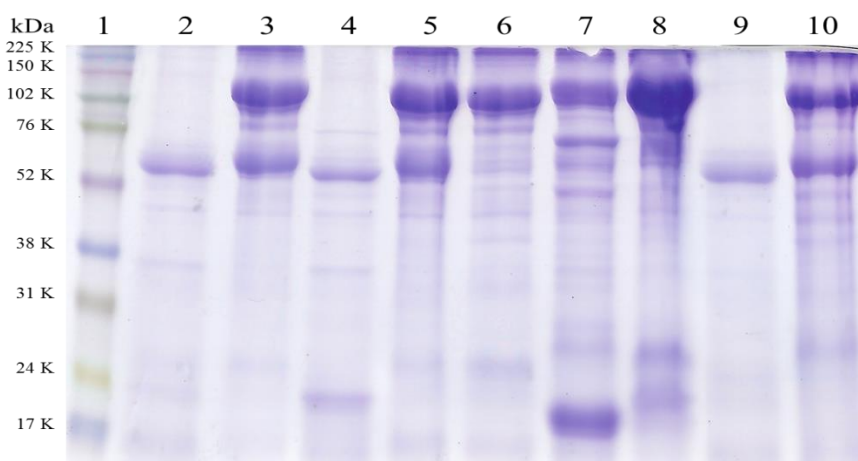


Figura 12 - Perfil protéico das estirpes selecionadas de *B. thuringiensis*. A preparação esporo/cristal das culturas foi submetida à eletroforese em gel de acrilamida 10%. 1: marcador de massa molecular Rainbow (GE); 2: S93; 3: S607; 4: S608; 5: S1191; 6: S1264; 7: 1269; 8: S1287; 9: S1289; 10: S1304.

Proteínas de massa molecular de 130 kDa estão relacionadas com o padrão característico das proteínas da família Cry1, que são efetivas contra coleópteros e lepidópteros (BRAVO *et al.*, 2004) e o perfil de 65 kDa é característico das proteínas da família Cry2, que é ativa contra lepidópteros e dípteros (CRICKMORE *et al.*, 1998; BRAVO *et al.*, 2004).

Foram obtidos por meio de PCR amplicons de tamanho esperados para a detecção de genes das classes *cry1* e *cry2*, não sendo obtido nenhum resultado positivo para os outros iniciadores testados.

Os amplicons com maior frequência nas estirpes testadas foram correspondentes aos genes *cry1Aa* (13 estirpes), *cry1Ab* (19), *cry1Ac* (10), *cry1B* (12), *cry2Aa* (14) e *cry2Ab* (17). Seis estirpes apresentaram amplicons para o gene *cry1E*, quatro para *cry1F* e três para *cry1Ad*, *cry1D* e *cry1G*. Apenas as estirpes S1295 e S2122 apresentaram amplicons para o gene *cry1C*.

Os resultados do perfil protéico e da caracterização molecular das estirpes com mortalidade de 100% para *H. armigera* pode ser visualizado na tabela 8.

Tabela 8 – Estirpe, sorotipo, conteúdo gênico e perfil protéico das estirpes de *B. thuringiensis* que apresentaram 100% de mortalidade à *H. armigera*

Estirpes	Sorotipo	Conteúdo gênico	Perfil protéico (kDa)
S93	Ns	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry2Aa</i>	65
S601	Ns	<i>cry1B</i>	130
S607	<i>kurstaki</i>	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B, cry2Aa, cry2Ab</i>	130-65
S608	<i>fokuokaensis</i>	<i>cry, 1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1E, cry2Aa, cry2Ab</i>	65
S615	<i>sotto</i>	<i>cry1Ab, cry1Ac, cry1B, cry1G, cry2Aa, cry2Ab</i>	130-65
S616	<i>aizawai</i>	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ad, cry1E, cry1F, cry2Ab</i>	130-65
S845	<i>kurstaki</i>	<i>cry1Aa, cry1B, cry2Ab</i>	130
S1191	Ns	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B, cry2Aa, cry2Ab</i>	130-65
S1258	<i>kurstaki</i>	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B, cry2Aa, cry2Ab</i>	130-65
S1261	Ns	<i>cry1Ac, cry1E, cry2Aa, cry2Ab</i>	130
S1264	<i>kurstaki</i>	<i>cry1Ab, cry1Ac, cry2Aa</i>	130
S1269	<i>thuringiensis</i>	<i>cry1Ac, cry1B</i>	130
S1287	Ns	<i>cry1Ab, cry1B, cry1F, cry1G</i>	130
S1289	Ns	<i>cry1Ab, cry1Ad, cry2Ab</i>	65
S1295	<i>aizawai</i>	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1C, cry1D, cry1E, cry2Ab</i>	130
S1301	<i>morrisoni</i>	<i>cry1Ab, cry1D, cry1F, cry1G</i>	130
S1304	<i>tolworthi</i>	<i>cry1Ab, cry1B, cry1E, cry2Aa, cry2Ab</i>	130-65
S1307	Ns	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1B, cry1E, cry2Aa, cry2Ab</i>	130-65
S1450 HD-1	<i>kurstaki</i>	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B, cry2Aa, cry2Ab</i>	130-65

continuação Tabela 8 – Estirpe, sorotipo, conteúdo gênico e perfil protéico das estirpes de *B. thuringiensis* que apresentaram 100% de mortalidade à *H. armigera*

Estirpes	Sorotipo	Conteúdo gênico	Perfil protéico (kDa)
S1905	<i>kurstaki</i>	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B, cry2Aa, cry2Ab</i>	130-65
S1979	Ns	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B, cry2Aa, cry2Ab</i>	130-65
S2122	<i>kurstaki</i>	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ad, cry1C, cry1D, cry1F, cry2Ab</i>	130
S2124	<i>kurstaki</i>	<i>cry1Ab, cry1E, cry2Aa, cry2Ab</i>	130-65

As estirpes S607, S1191, S1258, S1905, S1979 apresentaram perfil protéico e gênico semelhantes ao da estirpe padrão S1450 Btk HD-1 (*cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B, cry2Aa* e *cry2Ab*), sendo que apenas a S1191 e S1979 não são consideradas *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* por ainda não terem sido identificadas. Com o fechamento do Instituto Pasteur em 2000 a obtenção do anticorpo para sorotipagem tornou-se mais difícil, não permitindo identificação das subespécies das estirpes.

As proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab são descritas tóxicas para *H. armigera* (CHAKRABARTI *et al.*, 1998; LIAO *et al.*, 2002).

As duas estirpes que apresentaram amplicon para o gene *cry1C* apresentaram também para o gene *cry1Aa*. Estudos observaram que a toxina Cry1C possui um sinergismo com a toxina Cry1Aa em lagartas de *H. armigera* (XUE *et al.*, 2005; LI & BOUWER, 2014).

Estudo realizado por Ben-Dov *et al.* (1997) encontrou em *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-133 a presença dos genes *cry1Aa, cry1Ab, cry1C, cry1D, cry2Ab*; *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HDB-8 os genes *cry1Ab, cry2Aa, cry2Ab*; *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* HD-2 o gene *cry1B*; *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 os genes *cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry2Aa, cry2Ab*, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho.

A proteína Cry1B, possui massa molecular de 140 kDa e é tóxica aos lepidópteros e aos coleópteros (TAILOR *et al.*, 1992). A proteína Cry1F já foi encontrada em *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* e *morrisoni* (CRICKMORE *et al.*, 2015) e subsp. *kurstaki* (MACEDO *et al.*, 2012), corroborando com o resultado encontrado.

As proteínas Cry2Aa apresentam toxicidade aos lepidópteros e aos dípteros, enquanto a Cry2Ab possui atividade somente contra lepidópteros (Bravo *et al.*, 2004).

Em pesquisas futuras bioensaios de dose devem ser realizados para a determinação da CL50 das 23 estirpes, bem como para as toxinas individualizadas e em conjunto, visando

confirmar quais são responsáveis pela mortalidade das lagartas de *H. armigera* e avaliar se há um possível efeito sinérgico.

Novos bioinseticidas formulados com *B. thuringiensis* de diferentes subespécies e que contenham diferentes genes são importantes para o manejo da resistência de insetos.

3.4 Determinação da capacidade de promoção de crescimento por estirpes de *B. thuringiensis*

As 100 estirpes de *B. thuringiensis* analisadas neste trabalho não apresentaram capacidade de fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de sideróforos *in vitro*. 100% das amostras foram positivas para a produção de AIA. A quantidade de AIA variou de 1,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (estirpe S93) a 7,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (estirpe 1983) (Tabela 9).

Das estirpes testadas 16 apresentaram produção de AIA entre 1 e 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 52 entre 2 e 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 26 estirpes apresentaram entre 3 e 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Apenas 6 estirpes apresentaram uma produção de AIA acima de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que dessas apenas as estirpe S1292 e S1983 produziram acima de 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 9 – Caracterização bioquímica das estirpes de *B. thuringiensis* na produção de metabolitos secundários com capacidade de promoção de crescimento vegetal

Estirpes	Fixação de Nitrogênio	Solubilização de fosfato	Produção de sideróforos	Produção de auxinas ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Estirpes	Fixação de Nitrogênio	Solubilização de fosfato	Produção de sideróforos	Produção de auxinas ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
S29	N	N	N	1,17	S1258	N	N	N	2,91
S40	N	N	N	1,70	S1261	N	N	N	2,80
S62	N	N	N	2,78	S1262	N	N	N	2,82
S93	N	N	N	3,12	S1264	N	N	N	2,96
S165	N	N	N	3,26	S1269	N	N	N	3,37
S202	N	N	N	2,85	S1271	N	N	N	1,79
S392	N	N	N	2,10	S1272	N	N	N	2,87
S406	N	N	N	2,19	S1275	N	N	N	2,26
S407	N	N	N	3,16	S1285	N	N	N	4,51
S408	N	N	N	2,98	S1286	N	N	N	2,53
S411	N	N	N	3,39	S1287	N	N	N	2,62
S456	N	N	N	3,40	S1288	N	N	N	5,97
S459	N	N	N	2,20	S1289	N	N	N	3,72
S467	N	N	N	3,42	S1290	N	N	N	5,12
S490	N	N	N	2,69	S1291	N	N	N	4,92

(N) resultado negativo

continuação Tabela 9 - Caracterização bioquímica das estirpes de *B. thuringiensis* na produção de metabolitos secundários com capacidade de promoção de crescimento vegetal

Estirpes	Fixação de Nitrogênio	Solubilização de fosfato	Produção de sideróforos	Produção de auxinas ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Estirpes	Fixação de Nitrogênio	Solubilização de fosfato	Produção de sideróforos	Produção de auxinas ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
S511	N	N	N	3,26	S1292	N	N	N	7,18
S550	N	N	N	1,55	S1295	N	N	N	2,71
S597	N	N	N	2,11	S1301	N	N	N	2,35
S599	N	N	N	3,19	S1304	N	N	N	5,82
S601	N	N	N	2,29	S1307	N	N	N	2,82
S602	N	N	N	2,85	S1342	N	N	N	2,05
S607	N	N	N	2,98	S1365	N	N	N	2,31
S608	N	N	N	3,14	S1450	N	N	N	3,64
S612	N	N	N	2,09	S1457	N	N	N	2,84
S615	N	N	N	3,24	S1530	N	N	N	2,40
S616	N	N	N	3,99	S1704	N	N	N	2,62
S617	N	N	N	2,52	S1806	N	N	N	3,51
S655	N	N	N	2,08	S1905	N	N	N	2,74
S700	N	N	N	2,26	S1974	N	N	N	3,91
S711	N	N	N	2,95	S1975	N	N	N	5,02
S728	N	N	N	2,95	S1976	N	N	N	4,46
S755	N	N	N	2,73	S1977	N	N	N	4,13
S763	N	N	N	3,18	S1978	N	N	N	2,27
S764	N	N	N	1,97	S1979	N	N	N	3,17
S844	N	N	N	3,63	S1982	N	N	N	2,41
S845	N	N	N	3,13	S1983	N	N	N	7,44
S907	N	N	N	2,85	S1984	N	N	N	2,17
S1026	N	N	N	2,52	S1985	N	N	N	3,03
S1067	N	N	N	3,38	S1986	N	N	N	1,83
S1089	N	N	N	2,96	S1989	N	N	N	4,96
S1092	N	N	N	3,17	S1990	N	N	N	2,03
S1094	N	N	N	2,02	S1995	N	N	N	2,50
S1166	N	N	N	2,77	S2001	N	N	N	2,87
S1167	N	N	N	3,27	S2004	N	N	N	4,94
S1179	N	N	N	2,93	S2005	N	N	N	4,58
S1185	N	N	N	2,16	S2006	N	N	N	4,78
S1191	N	N	N	2,59	S2007	N	N	N	2,71
S1192	N	N	N	3,99	S2021	N	N	N	2,92
S1225	N	N	N	1,63	S2122	N	N	N	3,12
S1257	N	N	N	2,31	S2124	N	N	N	4,93

(N) resultado negativo

Estudo realizado por Felestrino (2013) com diferentes isolados dentre eles *Bacillus spp.* não obteve nenhum isolado com capacidade de solubilização de fosfato *in vitro* utilizando a mesma metodologia deste trabalho. Wang *et al.* (2014), utilizando outra metodologia verificou em uma estirpe de *B. thuringiensis* a capacidade de solubilização de P e eficácia na solubilização de AlPO_4 (até 321 mg mL^{-1}) *in vitro*.

Williams *et al.*, (2012), estudando a estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ATCC33679 observou que esta produzia catecol um tipo de sideróforos em maiores quantidades quanto cultivada a uma temperatura de 25°C , este resultado foi encontrado utilizando uma metodologia diferente.

Trabalhos relacionados à detecção da produção de metabólitos secundários com capacidade de promoção de crescimento vegetal por estirpes de *B. thuringiensis* são poucos, por isso as metodologias escolhidas para este trabalho são as mais utilizadas para os outros microrganismos.

Pedrinho (2009) atribuiu à baixa atividade da nitrogenase dos isolados testados ao fato de que estes foram purificados e cultivados por longo período em meio com fonte de nitrogênio, sendo que a regulação metabólica pode levar a perda da atividade enzimática, uma vez que a eficiência do processo de fixação de nitrogênio demanda muita energia do metabolismo bacteriano e que a qualidade e quantidade da fonte de carbono utilizada no meio de cultura podem influenciar a ausência da atividade enzimática da nitrogenase.

Assim, também se faz necessário realizar o teste de fixação de nitrogênio utilizando outras metodologias e a identificação molecular do gene *nif-H* nas estirpes de *B. thuringiensis* avaliadas neste trabalho.

Resultados semelhante com estirpes de *B. thuringiensis* foi encontrado por Raddadi *et al.* (2008) que observou uma produção de AIA entre $1,53$ a $9,71 \mu\text{g mL}^{-1}$, confirmando que estirpes de Bt são capazes de produzir AIA *in vitro*.

Bergamaschi (2006) verificou a produção de ácido indol-acético *in vitro* por diferentes isolados de bactérias do solo e obteve uma produção de AIA variando de $0,70$ a $10,70 \mu\text{g mL}^{-1}$. Silveira (2008) verificou uma produção de AIA entre $0,96$ e $29,45 \mu\text{g mL}^{-1}$, em diferentes isolados sendo alguns do gênero *Bacillus*. Trabalho realizado por Pedraza *et al.* (2004) obteve uma produção de AIA mais alta de $27,36 \mu\text{g mL}^{-1}$ com a estirpe UAP14 *Azospirillum brasilense*. Ambos os estudos foram realizados com a adição de L-triptofano e os resultados encontrados semelhantes a este trabalho.

Valores semelhantes de produção de AIA foram encontrados por Kuss (2006) que verificou que todos os isolados testados produziram entre 2,79 e 13,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$, porém em um meio de cultura sem adição de L-triptofano. Confirmando que existem rotas diferentes para a produção de auxinas por microrganismos.

Beneduzi *et al.* (2008), verificou em isolados do gênero *Bacillus* que alguns produziam alta quantidade de AIA, além de produzir sideróforos e fixar nitrogênio e também promover uma aumento significativo nas raízes e parte aérea de arroz irrigado, bem como o acréscimo de 30% em relação a testemunha.

A quantidade de AIA produzida por bactérias depende da multiplicação bacteriana, atividade metabólica e da expressão dos genes que codificam as enzimas da rota biossintética de AIA (LAMBRECHT *et al.*, 2000).

Das 100 estirpes analisadas 45 apresentaram amplicons esperados para todos os genes avaliados (Tabela 10), sendo que 71 estirpes apresentaram amplicons de tamanhos esperados para o gene codificador da enzima fosfatase ácida (Figura 13), 57 foram positivos para os genes da via de síntese de sideróforos (Figura 14).

Os genes envolvidos nas rotas de biossíntese do hormônio AIA se mostraram mais frequentes em estirpes de Bt, sendo que das estirpes analisadas 91 foram positivos para a presença do gene *ipdC* (Figura 15), 97 para o genes *iam1* e 93 para o gene *iam2*.

Tabela 10 – Caracterização molecular das estirpes de *B. thuringiensis* para a presença dos genes de promoção de crescimento vegetal

Estirpes	Gene fosfatase ácida	Gene sideróforos	Gene ipdC	Gene iam1	Gene iam2	Estirpes	Gene fosfatase ácida	Gene sideróforos	Gene ipdC	Gene iam1	Gene iam2
S29	+	+	+	+	+	S1258	+	+	+	+	-
S40	+	-	+	+	+	S1261	+	-	+	+	+
S62	+	+	+	+	+	S1262	+	+	+	+	+
S93	+	-	+	+	+	S1264	+	+	+	+	+
S165	+	-	+	+	+	S1269	-	-	+	+	+
S202	+	+	+	+	-	S1271	-	-	+	+	+
S392	-	-	+	-	-	S1272	-	-	+	+	-
S406	+	-	+	+	+	S1275	-	-	+	+	+
S407	+	+	+	+	+	S1285	-	-	+	+	+
S408	+	+	+	+	+	S1286	-	-	+	+	+
S411	+	+	+	+	+	S1287	+	-	+	+	+

(-) amostras que não apresentaram produto de amplificação para o gene testado; (+) amostras que apresentaram produto de amplificação para o gene testado.

continuação Tabela 10 - Caracterização molecular das estirpes de *B. thuringiensis* para a presença dos genes de promoção de crescimento vegetal

Estirpes	Gene <i>fosfatase ácida</i>	Gene <i>sideróforos</i>	Gene <i>ipdC</i>	Gene <i>iam1</i>	Gene <i>iam2</i>	Estirpes	Gene <i>fosfatase ácida</i>	Gene <i>sideróforos</i>	Gene <i>ipdC</i>	Gene <i>iam1</i>	Gene <i>iam2</i>
S456	-	+	-	+	-	S1288	+	+	-	+	+
S459	+	+	+	+	+	S1289	+	+	+	+	+
S467	+	-	+	+	+	S1290	+	+	+	+	+
S490	+	+	+	+	+	S1291	+	+	-	+	+
S511	+	+	+	+	+	S1292	-	+	-	+	+
S550	+	-	-	+	+	S1295	+	+	+	+	+
S597	+	+	+	+	+	S1301	+	+	+	+	+
S599	+	+	+	+	+	S1304	+	+	+	+	+
S601	+	-	+	+	+	S1307	+	-	+	+	+
S602	+	+	+	+	+	S1342	+	-	+	+	+
S607	+	-	+	+	+	S1365	-	-	+	+	+
S608	-	-	+	+	+	S1450	+	+	+	+	+
S612	+	+	+	+	+	S1457	+	-	+	+	-
S615	+	+	+	+	+	S1530	+	+	+	-	+
S616	+	+	+	+	+	S1704	-	-	+	+	+
S617	+	-	+	+	+	S1806	+	+	-	+	+
S655	+	+	+	+	+	S1905	+	-	+	+	+
S700	+	+	+	+	+	S1974	-	-	+	+	+
S711	+	+	+	+	+	S1975	-	-	+	+	+
S728	+	+	+	+	+	S1976	-	-	+	+	-
S755	+	+	+	+	+	S1977	-	+	+	+	+
S763	+	+	+	+	+	S1978	-	-	+	+	+
S764	+	+	+	+	+	S1979	+	+	+	+	+
S844	-	+	+	+	+	S1982	+	+	+	+	+
S845	+	+	+	+	+	S1983	+	-	+	+	+
S907	+	-	+	+	+	S1984	-	-	+	-	+
S1026	-	-	+	+	+	S1985	-	-	-	+	+
S1067	+	+	+	+	+	S1986	-	-	+	+	+
S1089	+	-	+	+	+	S1989	+	-	+	+	+
S1092	+	+	+	+	+	S1990	-	-	-	+	+
S1094	+	+	+	+	+	S1995	-	-	+	+	+
S1166	-	-	+	+	+	S2001	+	+	+	+	+
S1167	-	+	-	+	+	S2004	+	+	+	+	+
S1179	-	-	-	+	+	S2005	+	+	+	+	+

(-) amostras que não apresentaram produto de amplificação para o gene testado; (+) amostras que apresentaram produto de amplificação para o gene testado.

continuação Tabela 10 - Caracterização molecular das estirpes de *B. thuringiensis* para a presença dos genes de promoção de crescimento vegetal

Estirpes	Gene <i>fosfatase ácida</i>	Gene <i>sideróforos</i>	Gene <i>ipdC</i>	Gene <i>iam1</i>	Gene <i>iam2</i>	Estirpes	Gene <i>fosfatase ácida</i>	Gene <i>sideróforos</i>	Gene <i>ipdC</i>	Gene <i>iam1</i>	Gene <i>iam2</i>
S1185	+	+	+	+	+	S2006	+	+	+	+	+
S1191	+	+	+	+	+	S2007	+	+	+	+	+
S1192	-	+	-	+	+	S2021	+	-	-	+	+
S1225	+	+	+	+	+	S2122	+	+	+	+	+
S1257	-	-	-	+	+	S2124	+	+	+	+	+

(-) amostras que não apresentaram produto de amplificação para o gene testado; (+) amostras que apresentaram produto de amplificação para o gene testado.

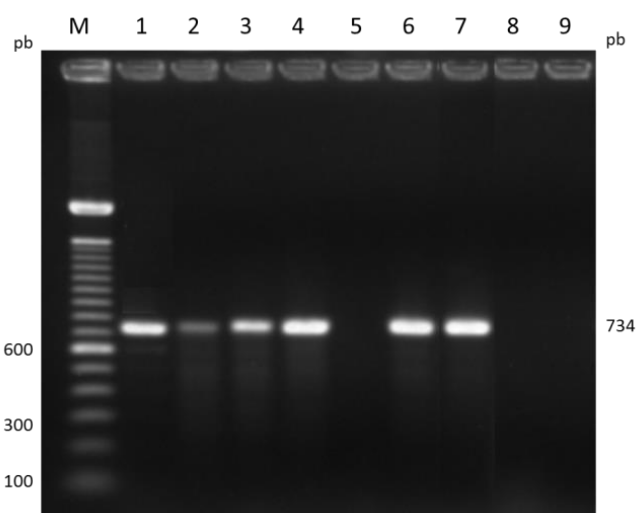


Figura 13 - Produtos de PCR obtidos para o gene *fosfatase ácida*. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando em M: marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder da Invitrogen; 1: S62; 2: S602; 3: S1191; 4: S1225; 5: S1271; 6: S1450; 7: S2124; 8: S1365; 9: controle negativo.

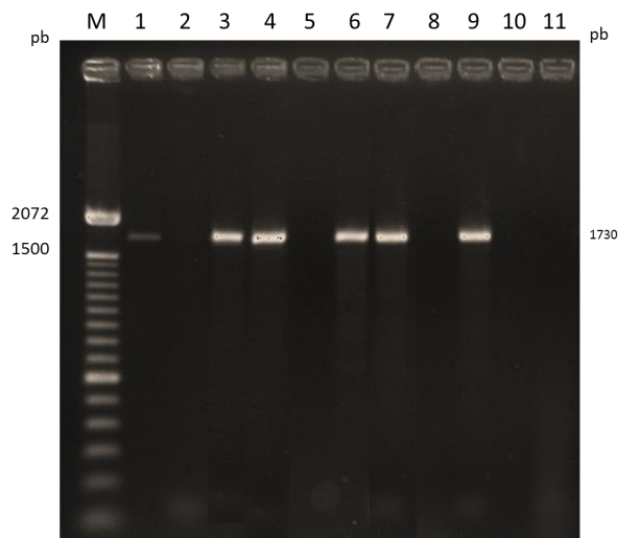


Figura 14 - Produtos de PCR obtidos para o gene *biossíntese de sideróforos*. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando em M: marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder da Invitrogen; 1: S62; 2: S608; 3: S1191; 4: S1225; 5: S1271; 6: S1450; 7: S2124; 8: S1365; 9: S1979; 10: S1985; 11: controle negativo.

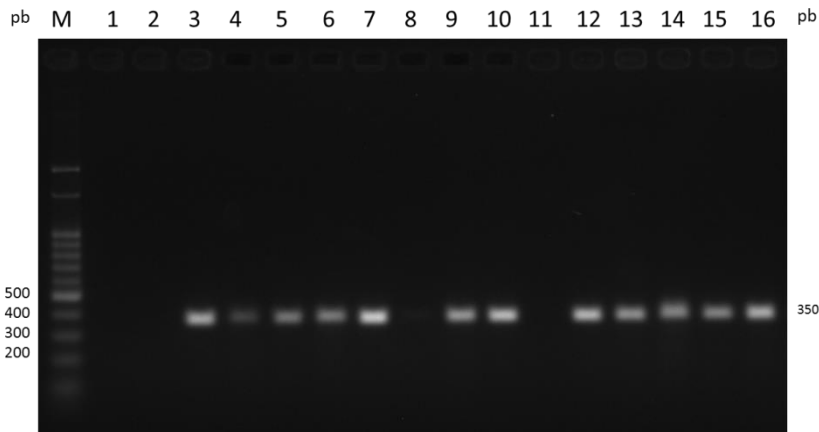


Figura 15 - Produtos de PCR obtidos para o gene *ipdC*. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando em M: marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Ludwig); 1: controle negativo; 2: S456; 3: S1089; 4: S1092; 5: S1094; 6: S1261; 7: S1264; 8: S1179; 9: S1983; 10: S1984; 11: S1985; 12: S1995; 13: S2001; 14: S2004; 15: S2005; 16: S2124.

Raddadi *et al.*, (2008) verificaram em algumas estirpes de *B. thuringiensis* a presença dos genes de biossíntese de *sideróforos*, *fosfatase ácida* e *ipdC*, sendo que algumas estirpes foram produtoras de AIA *in vitro* mas não apresentaram amplicons para o gene *ipdC*,

confirmando que a produção de AIA por bactérias pode ser também pela presença do gene *iam*, corroborando os resultados encontrados neste trabalho.

A presença dos genes *fosfatase ácida* e *sideróforos* em estirpes de *B. thuringiensis* mostra a necessidade de novos testes *in vitro* utilizando outras metodologias, a fim de determinar a melhor forma de detectar a produção de metabólitos secundários por esta espécie.

Considerando-se que a expressão de um gene resulta em um custo metabólico e que a expressão de genes está sob controle de sinais endógenos e exógenos (SALEEM *et al.*, 2010), são necessários estudos mais detalhados das condições ideais para a expressão dos genes de promoção de crescimento por estirpes de *B. thuringiensis*.

Trabalhos recentes mostram que estirpes de *B. thuringiensis* possuem potencial para serem utilizados como inoculante para a promoção de crescimento vegetal (WANG *et al.*, 2014; SANTANA, 2014; TANUJA *et al.*, 2013; BAI *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2003). Este trabalho mostrou que além de produzir auxinas possui também potencial para solubilização de fosfato e produção de sideróforos pela presença de genes.

Araujo & Guerreiro (2010) e Mehnaz & Lazarovits (2006) demonstraram que o isolado que expressou a maior produção de AIA *in vitro* não foi a que promoveu o maior crescimento das plantas, demonstrando assim que é necessária uma avaliação das estirpes de *B. thuringiensis* em *in vivo*.

A identificação das características relacionadas com a promoção de crescimento vegetal por PGPR *in vitro* não apresenta necessariamente correlação com as interações *in vivo* (SMYTH *et al.*, 2011), porém a caracterização bioquímica *in vitro* não podem ser negligenciadas devido ao grande número de isolados nos estudos de bioprospeção (BENEDUZI *et al.*, 2008; GOES *et al.*, 2012).

Bactérias capazes de promover o crescimento vegetal em culturas de importância econômica estão começando a ter uma relevância mais ampla nos sistemas de produção agrícola (SENTHILKUMAR *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos são promissores, no entanto há que se considerar a avaliação das estirpes em casa de vegetação e em campo, para poder afirmar o seu potencial como inoculante agrícola no Brasil.

CONCLUSÃO

Existem estirpes de *B. thuringiensis* altamente tóxicas a *H. armigera* e com potencial para a promoção de crescimento vegetal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

- Estirpes de *B. thuringiensis* são efetivas contra *H. armigera*, sendo necessário realizar bioensaios para determinar a CL50 e realizar ensaios de sinergismos das proteínas presentes nas estirpes, além de identificar os possíveis receptores para as proteínas de Bt.
- *B. thuringiensis* são produtoras de auxina *in vitro* e algumas possuem os genes *fosfatase ácida* e *sideróforos*, mostrando a necessidade de realizar novos testes *in vitro* para a detecção da solubilização de fosfato e produção de sideróforos.
- Estirpes de *B. thuringiensis* possuem potencial para a promoção de crescimento vegetal, sendo necessário realizar ensaios em casa de vegetação para selecionar a melhor estirpe para teste em campo.
- Realizar testes simultâneos utilizando *B. thuringiensis* como promotor de crescimento e controle de *H. armigera* de forma sistêmica em culturas de interesse econômico.

REFERÊNCIAS

- ALI, A.; CHOUDHURY, R. A. Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. **Tunisian Journal of Plant Protection**, v. 4, n. 1, p. 99-106, 2009.
- APAYDIN, O.C.; INAR, C., TURANLI, F., HARSA, S., GUNES, H. Identification and bioactivity of native strains of *Bacillus thuringiensis* from grain-related habitats in Turkey. **Biol Control**, v. 45, p. 21–28, 2008.
- ARAUJO, F.F.; GUERREIRO, R.T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 837-844, 2010.
- AZZOUZ, H.; KEBAILI-GHRIBI, J.; DAOUD, F.; ABDELMALAK, N.; ENNOURI, K.; BELGUITH-BEN HASSAN, N.; TOUNSI, S.; ROUIS, S. Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains toxic against pyralid stored-product pests. **Journal of applied entomology**, 2014.
- BAI, Y.X., ZHOU, X., SMITH, D.L. Enhanced Soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. **Crop Science**, v. 43, p. 1774–1781, 2003.
- BEHERE, G.T.; TAY, W.T.; RUSSELL, D.A.; BATTERHAM, P. Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.98, p.599-603, 2008.
- BEN-DOV, E.; ZARITSKY, A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAI, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TROITSKAYA, E.; DUBITSKY, A.; BEREZINA, N.; MARGALITH, Y. Microbiology Extended Screening by PCR for Seven cry-Group Genes from Field-Collected Strains of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, 1997.
- BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L. K.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; PASSAGLIA, L. M. P. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing *Bacilli* isolated from rice fields in south Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 39, p. 311–320, 2008.

BERGAMASCHI, C. **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a raízes e colmos de cultivares de sorgo**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BERRY, C.; O'NEIL, S.; BEN-DOV, E.; JONES, A.F.; MURPHY, L.; QUAIL, M.A.; HOLDEN, M.T.; HARRIS, D.; ZARITSKY, A.; PARKHILL, J. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 68, p. 5082–5095, 2002.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; CONDE, J.; MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; ZHUANG, M.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains. **Biochemistry Biophysical Acta**, v. 1667, p. 38–46, 2004.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 41, p. 423–431, 2011.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F.J.; GUADALUPE, P.NUNEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p. 4965-4972, 1998.

BUTT, B. A., CANTU, E. Sex determination of lepidopterous pupae, ARS. **United States Department of Agriculture**, Washington. v. 7, p. 33-75, 1962.

CATTELAN, A.J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, p. 36, 1999 (Embrapa Soja. Documentos, 139).

CERON, J.; ORTIZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECA, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Birmingham, v. 61, p. 3826-3831, 1995

CHAKRABARTI, S.K.; MANDAOKAR, A.; KUMAR, P.A.; SHARMA, R.P. Efficacy of lepidopteran specific δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 72, p. 336–337, 1998.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/. Acesso em: 30 janeiro 2015.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclatura for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal Crystal proteins. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.** v. 62, p. 807-813, 1998.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K.C.; VIVAN, L.M.; GUIMARÃES, H.O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, p.110-113, 2013.

FELESTRINO, E.B. **Isolamento e caracterização bioquímica e molecular de microrganismo associados à interação *Langsdorffia hypogaea* – Hospedeira-Rizosfera.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

GOES, K.C.G.P.; FISHER, M.L.C.; CATTELAN, A.J.; NOGUEIRA, M.A.; CARVALHO, C.G.P.; OLIVEIRA, A.L. M. Biochemical and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 437-447, 2012.

GOMES, A.M.A.; MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; MESQUITA, J.C.P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito da utilização de *Bacillus spp.* na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 699-703, outubro-dezembro 2003.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, p. 192-195, 1950.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

GUERCHICOFF, A.; DELECLUSE, A.; RUBINSTEIN, C. The *Bacillus thuringiensis* cytotoxins Genes for Hemolytic Endotoxins Constitute a Gene Family. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 1090-1096, 2001.

HARRISON, R.L.; BONNING, B.C. **Genetic engineering of biocontrol agents for insects.** In: Biology and biotechnology control of insect pests. Edited by Jack E. Rechaige and Nancy A. Rechagl. By CRC Press LLC. p. 243-280, 2000.

HOFTE, H., WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.** v.53, n.2, p. 242-255, 1989.

IBARRA, J.; RINCÓN, C.; ORDÚZ, S.; NORIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.G.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C.M.F.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M.H.; SÁNCHEZ, J.; PEÑA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5269-5274, 2003.

JAQUET, F.; HUTTER, R.; LUTHY, P. Specificity of *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin. **Applied And Environmental Microbiology**, p. 500-504, 1987.

KUSS, A.V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**: 227, 680-685, 1970.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A.V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends Microbiol**, v.8, p. 298-300, 2000.

LECADET, M.M.; CHAUF AUX, J.; RIBIER, J.E.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with diferente insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 840-849, 1991.

LI, H.; BOUWER, G. Evaluation of the synergistic activities of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 121, p. 7-13, 2014.

LIAO, C.; HECKEL, D.G.; AKURST, R. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton. **Journal of Invertebrate Pathology**, 2002, volume 80, p 55-63.

MACEDO, C.L.; MARTINS, E.S.; MACEDO, L.L.P.; SANTOS, A.C.; PRAÇA, L.B.; GÓIS, L.A.B.; MONNERAT, R.G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficiente contra *Diatrea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Pesq. Agropec. Bras.**, v.47, n.12, p.1759-1765, 2012.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans* and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, v.51, p.326-335, 2006.

MELLATI, V.; BATISTA, A.; DEMO, C.; PRAÇA, L.; BROD, C.; MONNERAT, R.G. **Determinação da susceptibilidade de *Spodoptera frugiperda* à diferentes subspecies de *Bacillus thuringiensis***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento n.º 88, 2005.

MENSAH, R. K. Suppression of *Helicoverpa spp.* (Lepidoptera: Noctuidae) oviposition by use of the natural enemy food supplement Envirofeast. **Australian Journal of Entomology**, v. 35, n. 4, p. 323-329, Nov. 1996.

MONNERAT, R.G., PRAÇA, L.B., MARTINS, E.S., DUMAS, V.D., RAMOS, F.R., BERRY, C. **Atividade de toxinas individuais de *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* contra larvas do Bicudo do Algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Cuculionidae)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento n.º 141, 12p., 2006.

MONNERAT, R.G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T. S.; MARTINS, E.; MELATTI, V.; PRAÇA, L.; DUMAS, V.; DEMO, C.; GOMES, A. C. M.; FALCAO, R.; BROD, C. S.; SILVA-WERNECK, J. O.; BERRY, C. Characterization of Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biological Control**, v. 41, p. 291-295, 2007.

MONNERAT, R.G.; SILVA, S.F.; SILVA-WERNECK, J.O. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus***. Brasília: Embrapa-Cenargen, 2001. 65p. (Documentos, 60)

PEDRAZA, R.O.; RAMIREZ-MATA, A.; XIQUI, M.L.; BACA, B.E. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiol Lett**, v. 233(1), p. 15-21, 2004.

PEDRINHO, E.A.N. **Isolados e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays*)**. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

RADDADI, N.; CHERIF, A.; BOUDABOUS, A.; DAFFONCHIO, D. Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis*. **Annals of Microbiology**, v.58, n.1, p.47-52, 2008.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

SALEEM, M.; LAMKEMEYER, T.; SCHÜTZENMEISTER, A.; MADLUNG, J.; SAKAI, H.; PIEPHO, H. P.; NORDHEIM, A.; HOCHHOLDINGER, F. Specification of cortical parenchyma and stele of maize primary roots by asymmetric levels of auxin, cytokinin, and cytokinin-regulated proteins. **Plant Physiology**, v. 152, p. 4-18, 2010.

SANTANA, F.S.C. ***Bacillus thuringiensis* como endofíticos em algodão: avaliação na promoção de crescimento e controle de *Spodoptera frugiperda***. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

SELDIN, L.; VAN ELSAS, I. D.; PENIDO, E. G. C. *Buciffus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and grass roots. **Internacional Journal of Systemic Bacteriology**, v. 34, p. 451-456, 1984.

SENTHILKUMAR, M.; ANANDHAM, R.; MADHAIYAN, M.; VENKATESWARAN, V.; AS, T. Endophytic bacteria: perspectives and applications in agricultural crop production, In: D.K. Maheshwari (Ed.), **Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems**, vol. XII, Springer, p. 61-96, 2011.

SHOJAADDINI, M.; LOPEZ, M.J.; MOHARRAMIPOUR, S.; KHODABAN- DEH, M.; TALEBI, A.A.; VILANOVA, C.; LATORRE, A.; PORCAR, M.A. *Bacillus thuringiensis* strain producing epizootics on *Plodia interpunctella*: a case study. **J Stored Prod Res**, v. 48, p. 52-60. 2012.

SILVA-WERNECK, J.O.; MONNERAT, R. **Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis***. Brasília: Embrapa-Cenargen, 2001. 5p. (Circular Técnica, 10).

SILVEIRA, E.L. **Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

SMYTH, E. M.; MCCARTHY, J.; NEVIN, R.; KHAN, M. R.; DOW, J. M.; O'GARA, F.; DOOHAN, F. M. *In vitro* analyses are not reliable predictors of the plant growth promotion capability of bacteria; a *Pseudomonas fluorescens* strain that promotes the growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 683-692, 2011.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, v.1, p.12-22, 1982.

TAILOR, R.; TIPPET, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 1211-1217, 1992.

TANUJA, R.; BISHT, S.C.; MISHRA, P.K. Ascending migration of endophytic *Bacillus thuringiensis* and assessment of benefits to different legumes of N.W. Himalayas. **European Journal of Soil Biology**, v.56, p.56-64, 2013.

WANG. T.; LIU, M.; LI H. f **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science**. v. 64, 2014

WILLIAMS, K.M.; MARTIN, W.E.; SMITH, J.; WILLIAMS, B.S.; GARNER, B.L. Production of protocatechuic acid in *Bacillus thuringiensis* ATCC33679. **Int. J. Mol. Sci.** v.13, p.3765-3772, 2012.

XUE, J.L.; CAI, Q.-X.; ZHENG D.-S.; YUAN, Z.-M. The synergistic activity between Cry1Aa and Cry1C from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. **Letters in Applied Microbiology**, 2005, 40, 460–465.