



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**INTERAÇÕES ENTRE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* E  
HÍBRIDOS DE REPOLHO VISANDO O CONTROLE DE *Plutella*  
*xylostella* E A PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL**

**LÍLIAN BOTELHO PRAÇA**

**TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA/ DF  
JUNHO/2012**



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

**INTERAÇÕES ENTRE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* E  
HÍBRIDOS DE REPOLHO VISANDO O CONTROLE DE *Plutella*  
*xylostella* E A PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL**

**LÍLIAN BOTELHO PRAÇA**

**ORIENTADORA: ROSE GOMES MONNERAT**

**TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**PUBLICAÇÃO 005D/2012**

**BRASÍLIA/ DF**  
**JUNHO/2012**



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

**INTERAÇÕES ENTRE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* E  
HÍBRIDOS DE REPOLHO VISANDO O CONTROLE DE *Plutella*  
*xylostella* E A PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL**

**LÍLIAN BOTELHO PRAÇA**

**ORIENTADORA: ROSE GOMES MONNERAT**

**TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**PUBLICAÇÃO 005D/2012**

**BRASÍLIA/ DF**  
**JUNHO/2012**

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

**INTERAÇÕES ENTRE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* E  
HÍBRIDOS DE REPOLHO VISANDO O CONTROLE DE *Plutella*  
*xylostella* E A PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL**

**LÍLIAN BOTELHO PRAÇA**

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À FACULDADE DE AGRONOMIA E  
MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE  
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR 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**

---

**Edison Ryoti Sujii, Dr. Pesquisador Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia (Examinador Externo) CPF 153.599.481-91.  
e-mail: edison.sujii@embrapa.br**

---

**Rogério Biaggioni Lopes Dr. Pesquisador Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia (Examinador Externo) CPF 201.889.248-76 e-mail:  
rogerio.lopes@embrapa.br**

---

**Maria Lucrécia Gerosa Ramos Dra. Professora Adjunto UnB- FAV  
(Examinador Interno) CPF 002.094.438-12 e-mail: lucrecia@unb.br**

---

**Jean Kleber de Abreu Mattos, Dr. Professor Adjunto UnB- FAV  
(Examinador Interno) CPF 002.288.181-68 e-mail: kleber@unb.br**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Praça, Lílian Botelho. **Interações entre estirpes de *Bacillus thuringiensis* e híbridos de repolho visando o controle de *Plutella xylostella* e a promoção do crescimento vegetal.**/ Lílian Botelho Praça; orientação de Rose Gomes Monnerat. – Brasília, 2012.

141 p.: il.

Tese de Doutorado (D) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2012.

1. *Bacillus thuringiensis* 2. Colonização 3. Repolho 4. Estirpes nativas 5. Endofíticos

I. Monnerat, R. G. II. Ph.D

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

**PRAÇA, L. B. Interações entre estirpes de *Bacillus thuringiensis* e híbridos de repolho visando o controle de *Plutella xylostella* e a promoção do crescimento vegetal. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012. 141 p. Tese de Doutorado.**

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Lílian Botelho Praça

TÍTULO DA TESE DE DOUTORADO: **Interações entre estirpes de *Bacillus thuringiensis* e híbridos de repolho visando o controle de *Plutella xylostella* e a promoção do crescimento vegetal**

GRAU: Doutor

ANO: 2012

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

---

Lílian Botelho Praça

CPF: 584.287.121-15

SQS 406 bloco M apto 303 Asa Sul

CEP 70.255-130- Brasília /DF – Brasil

Telefone: 61- 34437311 ou 81757311 e-mail: lilian.praça@embrapa.br

## **DEDICO**

*Á Deus, pai de todas as coisas, e ao Mestre Jesus por ser a luz da minha vida, por terem me propiciado a graça de ser mãe, que enriquece e alegam os meus dias, me trazendo maravilhosas oportunidades de aprendizado;*

*Às minhas ciumentinhas, Gabriela/Rafaela, Rafaela/Gabriela, com vocês aprendo todos os dias os desafios e o prazer de ser mãe, e a grandeza de um amor verdadeiro, AMO VOCÊS;*

*Aos meus pais, Vasco e Inês, pelo exemplo de amor, união, cumplicidade, companheirismo, que me ensinaram a viver a vida com dignidade e honestidade. O meu amor, admiração, respeito e gratidão!!!*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, **Dra Rose Monnerat**, pelos ensinamentos, amizade, carinho e apoio em todos os momentos, pela compreensão com as minhas ausências para que mais esta conquista acontecesse, pelas ideias fantásticas que enriquecerem esta tese, pela oportunidade, confiança e orientação na condução do desafio de realizar este trabalho;

Ao **Dr. Edison Sujii**, pela paciência de sempre, pelo aprendizado em estatística, mas principalmente pelas perguntas que me deixavam de cabelo em pé e que me ensinaram a pensar e tentar realizar a difícil missão de ser uma cientista e não somente executar uma pesquisa;

A **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, por ser a Empresa que tenho orgulho em trabalhar e por ter me ajudado a crescer como profissional dentro da Pesquisa Agropecuária Brasileira;

A todos os professores da Pós-graduação em Agronomia da Universidade de Brasília, em especial ao **Professor Jean e a Professora Lucrécia** que me propiciaram aprendizados inesquecíveis, além de um ambiente de descontração e amizade;

Ao **Rogério Lopes e Marcos Faria**, por todo profissionalismo, amizade, atenção e ajuda na administração dos projetos do laboratório durante a ausência da Rose para pós-doutorado;

As minhas queridas amigas da qualidade, **Cla, Lu, Neidinha, Marise, Lili** por tudo que aprendemos juntas nos últimos anos e, em especial, a **querida Helô**, por toda a amizade e horas divertidas e engraçadas que passamos juntas;

A todos os meus amigos e ex-colegas do Laboratório, em especial, **Paty, Vivi, Vini, Rafa, Eleny e Felipe** pelas horas de muita risada, lembranças e principalmente pelo carinho e amizade;

Ao casal Bradford, **Paulo e Érica**, é um grande prazer trabalhar com vocês e em especialmente a minha querida amiga, **Eriqueta**, pela amizade, parceria e apoio de sempre, peço a Deus que abençoe sempre o seu caminho!!!

As minhas amigas e colegas **Carlinha, Aninha e Gláucia**, vocês são dessas pessoas que Deus manda para fazer parte da vida da gente na hora certa, sou grata a vocês por tudo;

Á amiga, **Cris**, pelo carinho, amizade e dicas, você é uma pessoa muito especial e generosa;

Aos colegas e amigos do Laboratório, **Clara, Edylaine, Zezinho, Murilo (in memorian), Elias, Alda, Anita, Gabi, Tati, Flávia, Luiza e Lunalva e, em especial, a Fernanda**, por toda ajuda de sempre;

A todos os colegas do Prédio de Controle Biológico, em especial, **Zildinha, Irene, Débora, Dani, Renata, Valdec (in memoriam) e Cléo** pela amizade e agradável convivência;

À equipe da secretaria da Pós-Graduação da FAV, **Deusdete e Rosana**, pela presteza e atenção;

Aos meus irmãos, **Vasquinho e Luciana**, e meu cunhado **Wesley** pelo amor incondicional e respeito que temos uns pelos outros, pela certeza que tenho a cada dia da nossa união;

As minhas filhas amadas, **Rafa e Gabi** e os meus sobrinhos queridos, **Naty, Ique, Mari** pelas horas de convivência, palhaçada, cantorias, cavalgadas e muita união e amor que fazem de vocês a minha grande alegria;

À querida **Dinha Helda**, pelo exemplo de vida;

À **Tia Celmira**, mãezona do meu coração;

À Querida Emanuela, **Manu**, com a sua presença a Titia conseguiu tornar a difícil missão de perdoar um dos sentimentos mais grandiosos da minha vida, Obrigada;

Ao **grupo Corina Novelino**, da Comunhão Espírita, a convivência com vocês nos últimos anos me fortaleceu, ensinou, enriqueceu a minha vida. O Mestre Jesus sabe o quanto eu sou grata por esta convivência iluminada e grandiosa, muito obrigada;

Aos meus avôs, **Mário Praça e Maria Luiza**, as mensagens iluminadoras vinda de vocês foram fundamentais para o meu fortalecimento nos últimos anos;

Ao **Padrinho Acir** (in memoriam) e a **Dinha Lalau**, tenho certeza que estão felizes por esta conquista;

As minhas **Tias Queridas, as coragem**, em especial, **a Maringá e Tia Bia**, pelo carinho de sempre e por estarem junto aos meus pais todas as vezes que precisei estar ausente;

À querida **Tia Bila, Tio Fabiano e Tia Tiana**, pelas longas conversas e palavras de amizade e estímulo que me ajudaram a vencer as dificuldades que encontrei nos últimos anos;

De maneira muito especial aos meus primos **Rafa, Nenella, Ca, Dayanzinho, Zé Du, Xandi, Lu, Dudu, Bruno e André**, e aos queridos agregados, **Ju, Fábio, Lucinho, Margo, Henrique, Kátia, Cissa e Marcelo**, obrigada pelos nossos encontros inesquecíveis, amo todos vocês!

À família Furtado, a **Dona Zuca** e a **Susy**, por toda amizade e carinho que com certeza ajudam a suavizar a saudade que sinto da minha família e, em especial, ao meu ex-cunhado e amigo, **Márcio Furtado**, com certeza, meus trabalhos não seriam os mesmos se não fosse a sua ajuda incondicional de sempre, obrigada por tudo;

Às minhas amigas **Nubinha e Ete**, amigas raras, que Deus permita que a nossa grande amizade seja eterna;



À **Jaqui**, por todo o carinho com as minhas filhotas e com nossa casa;

À **Simone**, amiga da Patinação, pela disponibilidade e generosa ajuda com as meninas;

À amiga e terapeuta, **Ana Angélica**, pelas sábias orientações que me ajudam a conduzir a vida com mais leveza e paz;

Depois de quase quatro anos e meio, é uma grande alegria estar finalizando este trabalho e desejo a partir de agora mais qualidade de vida, muita diversão e alegria!!!

Agradeço a todos vocês que contribuíram  
para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO GERAL.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Cultura do repolho.....	4
2.2 <i>Plutella xylostella</i> .....	5
2.2.1 Aspectos gerais.....	5
2.2.2 Biologia do inseto.....	6
2.2.3 Estratégias de Controle.....	8
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	9
2.3.1 Aspectos gerais.....	9
2.3.2 Histórico.....	9
2.3.3 Toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	11
2.3.4 Modo de ação das proteínas Cry.....	17
2.4 Microrganismos endofíticos.....	18
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
<b>CAPÍTULO I - Seleção de estirpes brasileiras de <i>B. thuringiensis</i> tóxicas a <i>Plutella xylostella</i>.....</b>	<b>47</b>
RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	49
1INTRODUÇÃO.....	50
2 MATERIAS E MÉTODOS.....	51
2.1Estirpes e condições de crescimento.....	51
2.2 Bioensaios.....	52
2.3 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS–PAGE 10%).....	54
2.4 Preparações das amostras de DNA e Reação em cadeia da Polimerase .....	55
2.5 Microscopia Eletrônica.....	60
2.5.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	60
2.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	61
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

<b>CAPÍTULO II - Colonização endofítica de plantas de repolho por estirpes brasileiras de <i>Bacillus thuringiensis</i>.....</b>	<b>81</b>
RESUMO.....	82
ABSTRACT.....	83
1 INTRODUÇÃO.....	84
2 MATERIAS E MÉTODOS.....	85
2.1 Estirpes e condições de crescimento.....	86
2.2 Material vegetal.....	86
2.3 Ensaio de colonização de <i>B. thuringiensis</i> em híbridos de repolho.....	87
2.3.1 Ensaio 1.....	87
2.3.2 Ensaio 2.....	89
2.3.3 Ensaio 3.....	90
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
3.1 Ensaio 1.....	91
3.2 Ensaio 2.....	99
3.3 Ensaio 3.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
<b>CAPÍTULO III - Potencial de <i>Bacillus thuringiensis</i> como promotora de crescimento plântulas de repolho cultivadas <i>in vitro</i>.....</b>	<b>112</b>
RESUMO.....	113
ABSTRACT.....	114
1 INTRODUÇÃO.....	115
2 MATERIAS E MÉTODOS.....	116
2.1 Estirpes de <i>B. thuringiensis</i> .....	116
2.2 Material vegetal .....	117
2.3 Efeito de Bt na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas.....	117
2.4 Avaliação do desenvolvimento das plântulas.....	118
2.5 Efeito de Bt na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas.....	119
2.6 Bioensaio contra <i>P. xylostella</i> .....	120
2.7 Avaliação da capacidade da estirpe S1905 em sintetizar ácido indol acético, produzir sideróforos, solubilizar fosfato e fixar nitrogênio.....	121
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	122
4 CONCLUSÕES.....	136
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1 – SDS-PAGE 10% do complexo espora-cristal das estirpes de <i>B. thuringiensis</i> S1905, S2122 e S2124.....	65
Figura 2 - Produtos de PCR obtidos com iniciadores específicos para genes tipo <i>cryIB</i> das estirpes HD-1, S1905, S2122 e S2124.....	67
Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura da mistura espora-cristal de <i>B. thuringiensis</i> .....	70
Figura 4 - Microscopia eletrônica de transmissão da mistura esporos-cristais de <i>B. thuringiensis</i> .....	71

### CAPÍTULO II

Figura 1 – Colonização de solo, raízes, caules e folhas de plantas de repolho do híbrido Astro Plus por estirpes de <i>B. thuringiensis</i> durante onze semanas.....	93
Figura 2 – Colonização de solo, raízes, caules e folhas de plantas de repolho do híbrido Sekai por estirpes de <i>B. thuringiensis</i> durante nove semanas.....	95
Figura 3 – Colonização de solo, raízes, caules e folhas de plantas de repolho do híbrido Red Dynasty por estirpes de <i>B. thuringiensis</i> durante sete semanas.....	97
Figura 4 – Autoradiografia de plantas de repolho colonizadas com estirpes de <i>B. thuringiensis</i> marcadas com Metionina S <sup>35</sup> .....	99
Figura 5 – Plântulas de repolho colonizadas por <i>B. thuringiensis</i> com aspecto normal.....	100
Figura 6 – Micrografia eletrônica de varredura mostrando a colonização de diferentes partes das plântulas de repolho por estirpes de <i>B. thuringiensis</i> .....	102
Figura 7 – Micrografia eletrônica de varredura mostrando a colonização de diferentes partes das plântulas de repolho por estirpes de <i>B. thuringiensis</i> .....	105

## ÍNDICE DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1 – Características de iniciadores utilizados nas reações de PCR.....	56
Tabela 2 – Mortalidade de lagartas de 3º instar de <i>P. xylostella</i> tratadas com estirpes brasileiras de <i>B. thuringiensis</i> a.....	62
Tabela 3 – Concentração letal (CL <sub>50</sub> ) necessária das estirpes de <i>B. thuringiensis</i> para matar 50% da população de lagartas de terceiro instar de <i>P. xylostella</i> .....	64
Tabela 4 – Perfil protéico, genes <i>cry</i> e tipos de cristais presentes nas estirpes S1905, S2122 e S2124 e S1450 HD-1 de <i>B. thuringiensis</i> .....	66

### CAPÍTULO III

Tabela 1 – Efeito de estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre o percentual de germinação das sementes e o desenvolvimento de plântulas de repolho pós-germinação .....	123
Tabela 2 – Efeito de estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre o desenvolvimento de plântulas de repolho após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	124
Tabela 3 – Efeito dos diferentes tratamentos com a estirpe de <i>Bacillus thuringiensis</i> S1905 sobre o percentual de germinação das sementes e sobre o desenvolvimento de plântulas de repolho pós-germinação tratadas por 5 minutos .....	126
Tabela 4 – Efeito dos diferentes tratamentos com a estirpe de <i>Bacillus thuringiensis</i> S1905 sobre desenvolvimento de plântulas de repolho após 30 dias do tratamento das sementes por cinco minutos .....	127
Tabela 5 – Efeito dos diferentes tratamentos com a estirpe de <i>Bacillus thuringiensis</i> S1905 sobre o percentual de germinação e sobre o desenvolvimento de plântulas de repolho pós-germinação tratadas por 15 minutos.....	129
Tabela 6 – Efeito dos diferentes tratamentos com a estirpe de <i>Bacillus thuringiensis</i> S1905 sobre o desenvolvimento de plântulas de repolho após 30 dias do tratamento das sementes por 15 minutos.....	131
Tabela 7 – Efeito dos diferentes tratamentos com a estirpe de <i>Bacillus thuringiensis</i> S1905 sobre o percentual de germinação e sobre o desenvolvimento de plântulas de repolho pós-germinação tratadas por 30 minutos .....	132
Tabela 8 – Efeito dos diferentes tratamentos com a estirpe de <i>Bacillus thuringiensis</i> S1905 sobre o desenvolvimento de plântulas de Repolho após 30 dias do tratamento das sementes por 30 minutos.....	133
Tabela 9 – Mortalidade de lagartas de <i>P. xylostella</i> em plântulas tratadas com diferentes tratamentos com a estirpe de <i>B. thuringiensis</i> S1905.....	134
Tabela 10 - Produção de AIA pela estirpe de <i>B. thuringiensis</i> S1905 em diferentes meios de cultura.....	134

## Lista de Abreviaturas e Siglas

$\beta$	Beta
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal necessária para mata 50% da população testada
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
°C	Graus Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
g	grama
g/mL	grama/mililitro
h	horas
kDa	Quilo Dalton
L	Litro
M	Molar
mA	Miliampère
mg	Miligrama
min.	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	Milimolar
MS	Murashige e Skoog
PBS	Phosphate buffered saline ou tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoride
rpm	rotação por minuto
s	segundo
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturado com SDS
Subsp.	Subespécie
TBE	Tris-base
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Tris-HCl	Tris aminometano-ácido clorídrico
UV	Ultravioleta
V	Volt
x g	Velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
$\delta$	Delta

pvc	Policloreto de vinila
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar (micromol por litro)
$\mu\text{m}$	Micrometro
+	Positivo
-	Negativo
%	Porcentagem
$\pm$	Mais ou menos

# INTERAÇÕES ENTRE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* E HÍBRIDOS DE REPOLHO VISANDO O CONTROLE DE *Plutella xylostella* E A PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL

## RESUMO GERAL

*Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) é uma praga de grande importância econômica, devido aos danos provocados em cultivos de brássicas em todo o mundo. O controle desta praga é dificultado pela seleção de populações de insetos resistentes a vários inseticidas e pelo seu hábito críptico entre as folhas na cabeça do repolho. A colonização das plantas de forma endofítica por microrganismos apresenta-se como uma forma inovadora de controle sistêmico de pragas como *P. xylostella*. Este tipo de controle depende da seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* (Bt) com elevada eficiência contra o inseto-alvo associado à capacidade de penetração e colonização deste na planta. Neste trabalho foram selecionadas as estirpes S1905, S2122 e S2124 altamente tóxicas a *P. xylostella*. As estirpes S1905 e S2124 apresentaram perfil protéico de 130 e 65 kDa e a estirpe S2122 apenas a proteína de 130 kDa, fragmentos de DNA de tamanho esperado para a detecção de genes *cry1* e *cry2* e cristais bipiramidais, cubóides e redondos. A habilidade destas estirpes de Bt em colonizar endofiticamente diferentes híbridos de repolho foi observada através da detecção de células vegetativas, esporos e cristais nas diferentes partes das plantas de repolho. A predominância de colonização de Bt foi verificada nas raízes. As estirpes foram avaliadas quanto à promoção de crescimento em plantas de repolho. No tratamento das sementes por 15 minutos, o sedimento da estirpe S1905 com 48 horas de crescimento apresentou um incremento de 200% no tamanho inicial das plântulas, quando comparada com a testemunha. Este trabalho demonstrou pela primeira vez a habilidade de estirpes brasileiras de Bt em colonizar e promover o crescimento de plantas de repolho, além de protegê-las contra *P. xylostella*.

**Palavras-chave:** Colonização, estirpes nativas, traça-das-crucíferas, endofítica



# INTERACTIONS BETWEEN *Bacillus thuringiensis* STRAINS AND HYBRIDS OF CABBAGE TO CONTROL DIAMONDBACK MOTH AND PROMOTE PLANT GROWTH

## ABSTRACT

*Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) is a pest of great economic importance due to damage to brassica crops worldwide. The control of this pest is hindered by the selection of resistant populations to various insecticides and by its cryptic habit between the leaves of the cabbage head. The colonization of plants by endophytic microorganisms is an innovative way to control pests such as *P. xylostella*. The use of *Bacillus thuringiensis* (Bt) for endophytical control of the pest depends on the selection of strains with high efficiency against target insects associated with the ability to colonize and penetrate cabbage plants. This work aimed to select and characterize three Brazilian strains of *B. thuringiensis* toxic to *P. xylostella*. The S1905, S2122 and S2124 strains were highly toxic to *P. xylostella*. S1905 and S2124 showed two major proteins of 130 and 65 kDa, and S2122 showed only the protein of 130 kDa. The strains presented DNA fragments of the expected size for the detection of various specific *cry1* and *cry2* genes and bipyramidal, cuboidal and round crystals. The endophytic ability of *B. thuringiensis* to colonize plants was verified by the presence of vegetative cells, spores and crystals of the three *B. thuringiensis* strains in different parts of cabbage plants. The colonization of Bt occurs predominantly on roots. The strains were also evaluated in terms of promotion growth in cabbage plants. In seeds treatment for 15 minutes, the sediment of S1905 grown for 48 hours showed a growth promoting 200 times greater than the control. This study demonstrated for the first time the ability of Brazilian strains to colonize and promote the growth of cabbage plants and protect them against *P. xylostella*.

**Key words:** Colonization, cabbage, native strains, diamond moth, endophytic

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

Cerca de 15% das safras de alimentos do mundo são perdidas devido ao ataque de insetos. Seus danos variam de uma região para outra e seu controle é predominantemente realizado através do uso de inseticidas químicos, cujos gastos podem alcançar até 30% do custo de produção (SILVA-FILHO e FALCO, 2000, CASTELO BRANCO *et al.*, 2001).

A importância do controle de pragas e o aumento da consciência da população para os efeitos diretos e indiretos dos inseticidas na saúde pública e no ambiente, em geral, tem demandado novas formas de controle de insetos, como por exemplo, de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) importante praga de brássicas no Brasil.

*Plutella xylostella*, conhecida como traça-das-crucíferas, é uma praga causadora de elevados prejuízos em brássicas, principalmente em repolho, podendo ocasionar reduções de até 60% na produção (SILVA *et al.*, 1993, BIOCONTROLE, 2012).

Na Região Central do Brasil, o ataque de *P. xylostella* ocorre durante todo o ano, mas sua maior incidência acontece de julho a setembro, com período crítico de ataque em repolho, na formação da cabeça, aproximadamente entre a quarta e sétima semanas após o transplante (CASTELO BRANCO *et al.*, 2003).

A principal forma de controle da traça-das-crucíferas no Brasil é através da utilização intensa de inseticidas químicos (CASTELO BRANCO e MEDEIROS, 2001). Os piretróides e fosforados são os mais utilizados, com relatos de até 16 aplicações por cultivo (CASTELO BRANCO e GATEHOUSE, 1997). Esta prática tem levado à seleção de populações de insetos resistentes, principalmente onde o cultivo de brássicas é contínuo (BAEKA *et al.*, 2005). Além disso, pode causar poluição ambiental e aumentar os efeitos negativos na saúde humana, como causar câncer e várias desordens no sistema imunológico (DEVINE e FURLONG, 2007).

Como alternativa ao controle químico, métodos biológicos têm sido estudados e desenvolvidos, cabendo mencionar o uso de bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* que são produzidos e comercializados em todo o mundo para o controle de lagartas desfolhadoras.

Além desta forma de controle, estudos no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa foram iniciados, em 2003 com o intuito de verificar a possibilidade de utilização de *B. thuringiensis* (Bt) de forma sistêmica no controle de insetos-praga, uma vez que alguns destes insetos se alojam no interior das plantas, sendo de difícil alcance e com isso necessitam de medidas de controle mais eficientes (MONNERAT *et al.*, 2003). Esta poderá vir a ser uma alternativa de controle que poderá minimizar algumas limitações apresentadas por alguns agentes de controle biológico atualmente disponíveis como, por exemplo, a sensibilidade à radiação solar (BRAVO *et al.*, 2011).

Os estudos preliminares desenvolvidos pela Embrapa demonstraram que existem estirpes de *B. thuringiensis* colonizando tecidos de plantas de algodão (MONNERAT *et al.*, 2003), e que a estirpe padrão de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 uma vez inoculada nos solos próximo às raízes de plantas de algodão e de couve espalham-se por todos os tecidos, chegando aos insetos que se alimentavam dessas plantas (MONNERAT *et al.*, 2009).

Este estudo é pioneiro e único e aponta para uma possibilidade diferente do emprego desta bactéria para o controle de insetos. Portanto, os dados a serem gerados por este trabalho devem resultar em informações inéditas e importantes para a comunidade científica envolvida com a produção de *B. thuringiensis* para o controle de insetos. Esta forma de controle é interessante já que microrganismos endofíticos podem habitar o interior das plantas durante pelo menos um período do ciclo de suas vidas, sem causar danos às plantas e desempenhando um papel importante na proteção das plantas contra predadores e patógenos (AZEVEDO *et al.*, 2000) e promovendo o crescimento das mesmas.

Trata-se, portanto, de um assunto com potencial para desenvolvimento de uma nova técnica de controle de insetos, através da utilização sistêmica de *B. thuringiensis* que poderá proteger as plantas dos danos provocados pelo ataque de insetos, como também promover o crescimento das plantas hospedeiras destes insetos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cultura do repolho

As Brássicas são, entre as hortaliças, uma das principais fontes de alimento consumidas nos países desenvolvidos, ficando atrás apenas das Solanáceas (batata e tomate). Na Europa, Portugal e Espanha apresentam os maiores consumos por habitante. No Brasil, a preferência por estas hortaliças não é diferente, sendo o repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) a brássica mais consumida. Por sua importância em grande parte do território nacional, o cultivo do repolho concentra-se em cinturões verdes próximos às capitais e nas regiões serranas, sendo cultivada tanto pela agricultura familiar quanto por grandes produtores de hortaliças (ARAGÃO *et al.*, 2009).

O repolho é de grande importância tanto como alimento, por ser rico em vitaminas, sais minerais e aminoácidos que contém enxofre, metionina e cisteína (DOMINGOS, 2006 citado por SANTOS *et al.*, 2008) como na medicina, pela presença de glucosinolatos e por possuir propriedades antioxidantes (SANTOS *et al.*, 2008).

Graças ao trabalho de fitomelhoristas, várias são as cultivares de repolho desenvolvidas e que propiciam o cultivo em condições termoclimáticas diversificadas, possibilitando o plantio da cultura ao longo do ano, em diversas regiões produtoras (FILGUEIRA, 2000). Alguns exemplos são os híbridos Fuyutoyo, Kenzan, Astro Plus, Sekai, Caribe e outros que permitem grande flexibilidade na escolha da época de plantio e da região produtora. Assim, apesar da planta de repolho se adaptar melhor a um clima mais ameno e até frio, esta planta passou a ser cultivada em todas as estações do ano, não mais se restringido ao outono e inverno (FILGUEIRA, 2000).

O repolho é produzido principalmente na região sul do Brasil, tendo como principal produtor o Paraná. Em segundo lugar vem o Estado de São Paulo, seguido dos Estados do

Espírito Santo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul que produzem repolho em quantidades bem menores (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HORTICULTURA, 2008).

Em muitas regiões brasileiras, o repolho é cultivado ininterruptamente, o que favorece o ataque de pragas e doenças. Cenário que, associado à falta de manejo adequado, a condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento das pragas e a um uso intenso, muitas vezes abusivo, de produtos químicos têm como consequência o estabelecimento da traça-das-crucíferas.

## **2.2 *Plutella xylostella***

### **2.2.1 Aspectos gerais**

A traça-das-crucíferas *P. xylostella* é o principal fator limitante do cultivo de crucíferas em áreas tropicais do mundo, em razão, principalmente, de seu ciclo curto, alto potencial reprodutivo e conseqüentemente número anual elevado de gerações (ULMER *et al.*, 2002). É comumente referida como causadora de grandes prejuízos de modo particular em repolho, tanto no Brasil (CASTELO BRANCO *et al.*, 1996, FRANÇA e MEDEIROS, 1998) quanto em outros países produtores, podendo atacar também a couve-flor e a couve comum (TALEKAR e SHELTON, 1993; GODIN e BOIVIN, 1998).

A traça-das-crucíferas é uma espécie cosmopolita, provavelmente originária da região Mediterrânea. É encontrada na maior parte da América do Norte, na porção sudeste da América do Sul, Sudoeste da África, Europa, Índia, Sudoeste da Ásia, Nova Zelândia e em partes da Austrália (HARDY, 1938). Foi introduzida acidentalmente na Europa e primeiramente detectada na América do Norte em Illinois em 1854 e no oeste do Canadá (HARCOURT, 1962). Atualmente, está presente em todo os Estados Unidos e em muitas províncias do Canadá (MAU e KESSING, 2007). No Havaí, foi reportada pela primeira vez

em 1892 e atualmente está presente em toda a ilha. Pode ocorrer em todo o território brasileiro e, dependendo da região e época de plantio, pode reduzir consideravelmente o valor comercial da cultura por causar sérios danos ao atacar justamente a “cabeça”, que é a parte comercial do repolho (MELO *et al.*, 1994).

A maior ocorrência da *P. xylostella* é observada nos meses de menor precipitação, entre julho a setembro, sendo que o período crítico de ataque da praga ocorre na formação da cabeça, aproximadamente entre quatro e sete semanas após o transplante, podendo ocasionar perdas de até 60% na produção (BIOCONTROLE, 2012).

### **2.2.2 Biologia do inseto**

As fases do ciclo de vida de *P. xylostella* são: ovo, quatro instares larvais, pupa e adulto. As fêmeas podem depositar de 3 a 300 ovos, com uma produção média de 150 ovos. O número de ovos produzidos pelas fêmeas é influenciado pelo fotoperíodo, pela temperatura e pela idade ou pelas condições alimentares das larvas (MAU e KESSING, 2007). O último estágio larval é o mais voraz e causa mais injúrias que os três primeiros instares larvais. Os adultos possuem hábito noturno. O ciclo de vida, dependendo da temperatura, pode durar de 11 a 27 dias, ocorrendo de 14 a 30 gerações por ano (MAU e KESSING, 2007).

A fêmea de *P. xylostella* deposita seus ovos na parte inferior da folha, preferencialmente nas jovens (SILVA *et al.*, 1993; MAU e KESSING, 2007), na maioria das vezes isolados ou em grupo de dois ou três (SILVA *et al.*, 1993), mas podem chegar a até oito (MAU e KESSING, 2007). Esses ovos são arredondados, muito pequenos, de coloração amarela a esverdeada. Três ou quatro dias após a ovoposição, as lagartas eclodem, penetram no parênquima das folhas, onde se alimentam durante dois ou três dias para depois saírem das galerias e se alimentarem da epiderme da folha. Na forma jovem, apresenta-se como uma

pequena lagarta verde clara que chega a medir até 10 mm de comprimento. Pode atacar tanto folhas novas como as velhas, prejudicando o crescimento da planta e, conseqüentemente, o produto final. As lagartas perfuram as folhas, depreciando qualitativamente o produto, que se muito afetado, pode ter seu valor comercial prejudicado, ou tornar-se impróprio para o consumo (SILVA *et al.* 1993). Atingem o máximo desenvolvimento nove ou 10 dias após a eclosão, desenvolvendo-se bem em temperaturas acima de 20 °C (KIMOTO, 1993; BIOCONTROLE, 2012).

Quando se transformam em pupas tecem um pequeno casulo, facilmente reconhecido por ser constituído de pequenas malhas, na face inferior da folha ou outras áreas mais protegidas. Após quatro dias, dependendo da temperatura, emerge o adulto. O adulto é uma pequena mariposa de coloração parda, medindo em torno de 10 mm. Os machos quando em repouso exibem uma mancha clara em forma de diamante na face dorsal (GALLO *et al.*, 2002; BIOCONTROLE, 2012).

*Plutella xylostella* apresenta um curto período de desenvolvimento, alta fecundidade e crescimento rápido de suas populações, principalmente em condições de ausência de precipitação pluvial e temperaturas ao redor de 25 a 28 °C. É muito importante o conhecimento de sua biologia para um manejo adequado da cultura e controle do inseto-praga (CHEN *et al.*, 1996).



### 2.2.3 Estratégias de Controle

O uso de inseticidas tem sido a principal e muitas vezes a única medida de controle empregada no Brasil, dentre as medidas mais recomendadas para o controle da traça-das-crucíferas (FRANÇA *et al.*, 1985; TORRES *et al.*, 2006). No entanto, tem se verificado que alguns inseticidas recomendados como a deltametrina têm perdido eficiência, principalmente onde o cultivo de brássicas é contínuo (MELO *et al.*, 1994; PRAÇA *et al.*, 2010).

Muitos dos inseticidas utilizados chegam a ser aplicados até quatro vezes por semana, levando a seleção de populações de insetos resistentes (CASTELO BRANCO *et al.*, 2001). No Brasil, já existem alguns relatos de resistência de *P. xylostella* a diversos compostos químicos comumente utilizados para controle, como a abamectina (CASTELO BRANCO e MELO, 2002), deltametrina (PRAÇA *et al.*, 2010), piretróides e organofosforados (VASQUEZ *et al.*, 1995; CASTELO BRANCO e GATEHOUSE, 1997).

O conhecimento das características intrínsecas do inseto, sua biologia e a forma adequada de realizar a amostragem da área para um correto monitoramento da cultura são fundamentais para o uso de *B. thuringiensis* como bioinseticida. A praga deve ser controlada quando, após diagnóstico semanal realizado nas plantas escolhidas ao acaso, forem observados seis furos ou mais nas quatro folhas centrais do repolho (CASTELO BRANCO *et al.*, 1996).

Dentre as estratégias para auxiliar o controle do inseto, encontram-se o uso de cultivares resistentes e de feromônios (IMENES *et al.*, 2002), a rotação de cultura, o uso de armadilhas luminosas, o uso de reguladores de crescimento e a utilização de parasitóides (MONNERAT *et al.*, 2002).

Por ser a traça-das-crucíferas uma praga críptica na cabeça do repolho e de grande importância para esta cultura e, além disso, diversos estudos mostrarem a existência de

populações deste inseto resistentes a alguns princípios ativos de inseticidas, o uso de agentes de controle biológico como *B. thuringiensis* de forma sistêmica pode vir a ser uma alternativa promissora.

## **2.3 *Bacillus thuringiensis***

### **2.3.1 Aspectos gerais**

*Bacillus thuringiensis* (Berliner) é uma bactéria de ocorrência cosmopolita (KRYWUNCZYK e FAST, 1980), sendo encontrada em todas as partes do mundo, em vários substratos como solo, água, superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (BRAVO *et al.*, 1998). É uma bactéria Gram positiva e aeróbica, podendo facultativamente crescer em anaerobiose, dentro da faixa de 10 a 40 °C. A atividade entomopatogênica desta bactéria se deve à presença de inclusões protéicas cristalinas, produzidas durante o processo de esporulação, conhecidas por  $\delta$ -endotoxinas (MONNERAT e BRAVO, 2000; BRAVO *et al.*, 2005).

Estas toxinas são altamente específicas aos seus insetos-alvo, inócuas ao ser humano, vertebrados e plantas e tem efeito não poluente ao meio ambiente, por serem completamente biodegradáveis (WHITELEY e SCHNEPF, 1986; BRAVO *et al.*, 2005).

### **2.3.2 Histórico**

Esta bactéria foi descrita em 1901, no Japão, pelo bacteriologista Ishiwata, que descobriu ser ela a bactéria responsável pela mortalidade de larvas do bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Em 1911, Berliner, um microbiologista alemão, descreveu novamente a mesma bactéria, isolada a partir de larvas mortas de *Anagasta kuehniella* Zeller

(Lepidoptera: Pyralidae), a traça da farinha, praga de grãos armazenados e a chamou *B. thuringiensis*, em homenagem a Thuringia, na Alemanha, onde as lagartas foram coletadas. Em 1915, este mesmo autor notou a presença de inclusões parasporais nas células de *B. thuringiensis* e em 1953, Hannay trabalhando com esta espécie, sugeriu pela primeira vez que a patogenicidade podia estar associada às inclusões cristalinas formadas nas células durante a esporulação. Em 1968, Angus demonstrou que a hipótese de Hannay era válida (ISHIWATA, 1901; BERLINER, 1911, 1915; HANNAY, 1953; ANGUS, 1968).

A primeira formulação à base dessa bactéria, a Sporeíne, foi produzida na França em 1938. Na década de 50, iniciou-se a produção em larga escala, com o lançamento do bioinseticida comercial “Thuricide”, seguido por produtos similares de empresas localizadas na Rússia, na Checoslováquia, na Alemanha e nos Estados Unidos (DE MAAGD *et al.*, 1999). No princípio de 1998, existiam nos Estados Unidos mais de 200 produtos registrados à base de *B. thuringiensis* (SCHNEPF *et al.*, 1998). Inicialmente, os produtos eram utilizados somente para o controle de larvas de lepidópteros, mais tarde, principalmente a partir dos anos 1970, novas subespécies da bactéria se mostraram eficientes contra insetos das Ordens Diptera, Coleoptera (WEISER, 1986; EDWARDS *et al.*, 1988), Hymenoptera, Hemiptera e Orthoptera (FEILTEISON, 1994). Também foi relatada toxicidade para algumas espécies de nematóides, protozoários e ácaros (EDWARDS *et al.*, 1988; FEILTEISON, 1994). Estima-se que existam mais de 50.000 estirpes de *Bacillus* spp. em coleções espalhadas pelo mundo (MONNERAT *et al.*, 2001).

Atualmente, é o principal princípio ativo biológico produzido e utilizado ocupando 2% do total de inseticidas vendidos no mundo (ESTRUCH *et al.*, 1996; BAUM *et al.*, 1999; RAYMOND *et al.*, 2010) e conferindo níveis adequados e consistentes de controle (PRAÇA *et al.*, 2010). As formulações da maior parte dos produtos existentes no mercado são baseadas

nas estirpes de *B. thuringiensis* subespécie. *kurstaki* HD-1 (HARRISON e BONNING, 2000), *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* (BRAVO *et al.*, 2011).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Agricultura, existem oito produtos à base de *B. thuringiensis* no mercado para o controle de pragas agrícolas: Agree, Bac-Control PM, Bactur PM, Dipel, Dipel PM, Dipel WG, Ecotech Pro e Xentari. Estes produtos comerciais têm como princípios ativos às linhagens *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* que são utilizados no controle de lagartas desfolhadoras como: *P. xylostella* (traça-das-crucíferas), *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja) e outras espécies pertencentes à Ordem Lepidoptera. Além destes, está em fase de registro o produto Ponto Final de tecnologia nacional a base *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, que em breve será lançado pela empresa Bthek Biotecnologia Ltda para o controle de lagartas desfolhadoras.

### 2.3.3 Toxinas de *Bacillus thuringiensis*

*B. thuringiensis* produz diferentes fatores de virulência, como as  $\delta$ -endotoxinas,  $\alpha$ -exotoxina,  $\beta$ -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (HOFTE e WHITELEY, 1989; HANSEN e SALAMITOU, 2000). Algumas estirpes produzem toxinas inseticidas adicionais denominadas VIP. As toxinas VIP, são produzidas na fase de crescimento vegetativo. Pelo menos, três toxinas VIP foram caracterizadas VIP1/VIP2, toxina binária, e a VIP3.

As  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* são as mais promissoras e compreendem as proteínas Cry e Cyt. As toxinas Cry são tóxicas a diferentes insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera e a nematóides, enquanto as proteínas Cyt são na maioria das vezes tóxicas aos insetos da ordem Diptera (BRAVO *et al.*, 2005).

As proteínas Cry individualmente apresentam um espectro de ação, normalmente, restrito a uma Ordem de insetos em particular (DE MAAGD *et al.*, 2001) e a morfologia das mesmas é em forma de cristais. A análise destes cristais por microscopia de contraste de fases e do perfil eletroforético das proteínas Cry podem dar uma idéia inicial do espectro de ação destas proteínas (VALADARES-INGLIS *et al.*, 1998).

O processo de formação do cristal está ligado à esporulação. Estudos de cristalografia mostraram que o cristal é formado a partir do segundo estágio de esporulação e é liberado no momento em que as células são lisadas (MONNERAT e BRAVO, 2000). O cristal pode ser bipiramidal, cubóide, rombóide, ovóide, esférico ou, ainda, sem forma definida ou morfologia atípica (HABIB e ANDRADE, 1998; NOGUERA e IBARRA, 2010).

As proteínas Cry estão classificadas em 70 grupos e diferentes subgrupos, além de três grupos de toxinas Cyt, em função do grau de similaridade de seus aminoácidos. Essas proteínas são codificadas por mais de 665 genes *cry* já sequenciados (CRICKMORE *et al.*, 2012). A atualização constante destes dados pode ser acessada no endereço: [http://www.epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/).

Dentre as estirpes de *B. thuringiensis*, algumas apresentam um único gene codificador das proteínas Cry. Outras estirpes podem apresentar cinco genes diferentes, como é o caso da subespécie *aizawai* HD-137 e subespécie *israelensis* IPS-82. Esta última apresentou cinco genes codificadores das  $\delta$ -endotoxinas e um outro gene que codifica uma citolisina, todos localizados em um único plasmídeo de 72kDa (BOURGOUIN *et al.*, 1988; MARGALITH e BEN-DOV, 2000).

A maioria das estirpes de *B. thuringiensis* pode sintetizar mais de um tipo de cristal. Os cristais podem ser formados por diferentes  $\delta$ -endotoxinas e o peso molecular das  $\delta$ -endotoxinas pode variar entre 13,6 e 142 kDa (CRICKMORE *et al.*, 2007).

Dentre as toxinas mais estudadas, destacam-se Cry1 e Cry2 com amplo espectro inseticida a lepidópteros. Os genes *cry1* são os mais frequentes na natureza, representando mais de 43% dos genes *cry* caracterizados. Os cristais formados pela proteína Cry1 apresentam forma bipiramidal (ROSAS-GARCÍA *et al.*, 2008).

As toxinas da família Cry1 têm 44 subgrupos representados por Cry1Aa, ..., Cry1Ma (CRICKMORE *et al.*, 2012). Algumas destas proteínas são ativas contra insetos da Ordem Lepidoptera, como por exemplo, as toxinas Cry1Aa, Cry1Ja e Cry1Fb tóxicas a *Agrotis ipsilon*. No entanto, é importante salientar que as proteínas Cry1Aa e Cry1Fb apenas controlaram larvas neonatas desta praga em doses muito altas (DE MAAGD *et al.*, 2003) e foram isoladas de várias subespécies de *B. thuringiensis* como subespécie *kurstaki*, *aizawai*, *entomocidus*, *sotto* e *morrisoni*, apresentando massa molecular de 132 a 133 kDa. A proteína Cry1Ab foi isolada de três subespécies com massa molecular de 130 kDa (CRICKMORE *et al.*, 2007).

A toxina Cry1Ac foi isolada de uma estirpe de *B. thuringiensis* da ordem Lepidoptera denominada L1-2, foi identificada como tóxica ao adulto da mosca tse tse, *Glossina morsitans morsitans* e apresentou similaridade com gene *cry1Ac* de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 (OMOLO *et al.*, 1997). Esta estirpe apresentou toxicidade a *Manduca sexta* (ADANG *et al.*, 1985) e a larvas neonatas de *A. ipsilon* em doses muito altas (GILLILAND *et al.*, 2002). A toxina Cry1Ad foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* e apresentou proteína de 133 kDa e toxicidade a larvas de lepidópteros. A toxina Cry1Ae foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *alesti* e a toxina Cry1Ag de uma subespécie de *B. thuringiensis* ainda não identificada, ambas com massa molecular de 134kDa (CRICKMORE *et al.*, 2007). A toxina Cry1Af apresentou toxicidade tanto a insetos da Ordem Diptera como da Ordem Coleoptera e Cry1Ah e Cry1Ai foram isoladas de *B. thuringiensis*, porém não tiveram ainda seu alvo determinado (CRICKMORE *et al.*, 2007).

A proteína Cry1B possui sete subgrupos, sendo a proteína Cry1Ba isolada de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e de *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus*, a proteína Cry1Bb tóxica a larvas de lepidópteros, a Cry1Bc isolada de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni*, a Cry1Bd isolada de *Bacillus thuringiensis* subsp. *wuhanensis* e tóxica a larvas de *P. xylostella*, todas com massa molecular de 140 kDa, Cry1Be ativa contra lepidópteros com massa molecular de 139 kDa e as proteínas Cry1Bf e Cry1Bg ainda não tiveram seus alvos identificados (CRICKMORE *et al.*, 2007).

As toxinas Cry1Ca e Cry1Cb apresentam atividade contra espécies de *Spodoptera* (BRAVO *et al.*, 1998) e foram isoladas de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* e *entomocidus*, e *galleriae*, com massa molecular 134 e 133 kDa, respectivamente (CRICKMORE *et al.*, 2007). A toxina Cry1Cb apresentou toxicidade a *S. exigua* e *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) (KALMAN *et al.*, 1993). Cry1Da foi isolada de *B. thuringiensis* HD-68 e *aizawai* é ativa a larvas de *Manduca sexta* e *S. exigua* e apresenta massa molecular de 132 kDa. Já Cry1Db foi isolada de *B. thuringiensis* com massa molecular de 131 kDa e Cry1Dc ainda não teve seu alvo identificado (CRICKMORE *et al.*, 2007).

Algumas toxinas pertencentes à família Cry1 podem apresentar atividade dupla contra lepidópteros e dípteros e contra lepidópteros e coleópteros, como é o caso das proteínas Cry1Ca e Cry1Ba (BRADLEY *et al.*, 1995), respectivamente. Já a proteína Cry1Ba possui massa molecular de 140 kDa e especificidade e atividade inseticida contra lepidópteros (*Ostrinia nubilalis*) e coleópteros (*Leptinotarsa decimlineata*) (TAILOR *et al.*, 1992). Vale ressaltar que a proteína Cry1Ca também apresenta atividade contra mosquitos, da mesma forma que a proteína Cry1Ab (HAIDER e ELLAR, 1987; SMITH *et al.*, 1996) e a proteína Cry1Af (CRICKMORE *et al.*, 2007).

A proteína Cry1E apresenta eficiência no controle de *Spodoptera* sp. (LOGUERCIO *et al.*, 2001). Cry1Ea foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* que apresenta massa

molecular de 133 kDa e Cry1Eb foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* e apresenta massa molecular de 134 kDa, ambas tóxicas a larvas de lepidópteros (CRICKMORE *et al.*, 2007).

A proteína Cry1F é composta por dois subgrupos Cry1Fa e Cry1Fb que foram isolados de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* e *aizawai*, e apresentaram massa molecular de 134 e 132 kDa, respectivamente (CRICKMORE *et al.*, 2007). O cristal da toxina Cry1F é tóxico a larvas neonatas de alguns insetos da Ordem Lepidoptera como, por exemplo, *Ostrinia nubilalis* e *Spodoptera exigua* (CHAMBERS *et al.*, 1991).

As toxinas Cry1Ga e Cry1Gb apresentaram massa molecular de 132 e 133 kDa. A toxina Cry1Gb foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *wuhanensis* e apresentou toxicidade a larvas de *Pieris rapae* e a toxina Cry1Gc apresentou toxicidade a insetos da Ordem Lepidoptera (CRICKMORE *et al.*, 2007).

A toxina Cry1Ha com massa molecular de 133 kDa e a toxina Cry1Hb isolada de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* com massa molecular de 131 kDa ainda não tiveram seus alvos determinados (CRICKMORE *et al.*, 2007).

Existem outras proteínas inseticidas como a Cry1I que possuem seis toxinas em seu subgrupo: Cry1Ia, Cry1Ib, Cry1Ic, Cry1Id, Cry1Ie e Cry1If. A toxina Cry1Ia foi isolada a partir de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD133 e de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, que codificam este gene a partir dos primeiros estágios de esporulação (MASSON *et al.*, 1998; MARTINS *et al.*, 2008, 2010). É tóxica a insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera, com massa molecular de 81 kDa. Já a toxina Cry1Ib foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* e apresenta patogenicidade a alguns insetos das ordens Coleoptera e Lepidoptera, como *P. xylostella*. A toxina Cry1Id apresentou toxicidade às espécies *P. xylostella* e *Bombyx mori*. As toxinas Cry1Ic e Cry1Ie ainda não tiveram seus alvos identificados, a Cry1If



apresentou atividade contra lepidópteros e todas estas toxinas apresentaram massa molecular de 81 kDa (CRICKMORE *et al.*, 2007).

A toxina Cry1J possui quatro membros: Cry1Ja, Cry1Jb, Cry1Jc e Cry1Jd. Estas toxinas são ativas a insetos da Ordem Lepidoptera, porém larvas neonatas de *A. ipsilon* apresentaram uma menor sobrevivência e redução no crescimento das larvas apenas em doses muito altas. A Cry1Ja e Cry1Jb apresentaram massa molecular de 133 e 134 kDa, respectivamente. Já a proteína Cry1Jd é uma nova proteína inseticida (CRICKMORE *et al.*, 2007).

A proteína Cry1Ka, considerada tóxica a *Artogeia rapae* e não a *P. xylostella*, foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* e apresentou massa molecular de 137 kDa (KOO *et al.*, 1995; CRICKMORE *et al.*, 2007).

As últimas toxinas da família Cry1, a Cry1La também foi isolada como muitas outras a partir de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (CRICKMORE *et al.*, 2007) e a outra toxina mais recente detectada foi Cry1Ma, uma toxina naturalmente truncada presente em uma estirpe mexicana denominada LBIT-1189 e forma um cristal bipiramidal (NOGUERA e IBARRA, 2010).

A família de proteínas do tipo Cry2 é formada por nove membros: Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry2Ad, Cry2Ae, Cry2Af, Cry2Ag, Cry2Ah e Cry2Ai (CRICKMORE *et al.*, 2012) e foram isoladas da subespécie *kurstaki*. A toxina do tipo Cry2Ab apresenta 89% de identidade com a Cry2Aa e é altamente tóxica contra *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae), *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) e *T. ni* e não apresentou toxicidade contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). A toxina do tipo Cry2 é produzida por estirpes de várias subespécies de *B. thuringiensis* e apresenta alta atividade larvicida para insetos lepidópteros e baixa atividade para dípteros (DANKOCSIK *et al.*, 1990; WU *et al.*, 1991; PRAÇA *et al.*, 2004). Essas toxinas apresentam peso molecular de 65-70 kDa e formam

normalmente cristais cubóides (HOFTE e WHITELEY, 1989; LERECLUS *et al.*, 1989). Em 2008, foi identificada a proteína Cry2Af com atividade a *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) (BEARD *et al.*, 2008) e em 2010, a proteína Cry2Ag ativa a insetos da Ordem Diptera e Lepidoptera (ZHENG *et al.*, 2010). Mais recentemente foram identificadas as proteínas Cry2Ah e Cry2Ai, mas não há informações sobre o seu efeito inseticida até o momento (CRICKMORE *et al.*, 2012).

#### **2.3.4 Modo de ação das proteínas Cry**

As toxinas Cry e Cyt são, atualmente, conhecidas como toxinas formadoras de poro (PFT) que causam lise das células, levando a um choque osmótico (JAMES, 2009; BRAVO *et al.*, 2011). O modo de ação das toxinas Cry tem sido caracterizado principalmente em insetos lepidópteros e processo pode ser dividido em várias etapas: Solubilização e processamento das toxinas, união ao receptor, inserção na membrana, agregação, formação do poro e citólise.

Para que as proteínas de *B. thuringiensis* sejam efetivas, é necessário primeiramente que os estágios imaturos dos insetos susceptíveis ingiram os esporos e cristais de *B. thuringiensis*. As inclusões cristalinas ao serem ingeridas são solubilizadas no ambiente alcalino do intestino, liberando uma ou mais proteínas chamadas de proteínas Cry (KNOWLES, 1994; BOBROWSKI *et al.*, 2003, BRAVO *et al.*, 2005). As protoxinas solubilizadas são ativadas pelas proteases intestinais, liberando os polipeptídios tóxicos de 60-70 kDa (BRAVO *et al.*, 2005). Depois de ativadas, principalmente pelas tripsinas, as protoxinas perdem a porção C-terminal e em alguns casos, parte da porção N-terminal, ocorrendo a liberação do fragmento tóxico (parte ativa) (MONNERAT e BRAVO, 2000; RABINOVITCH *et al.*, 2000; BRAVO *et al.*, 2004). Estes fragmentos ligam-se a receptores específicos localizados nas microvilosidades apicais das membranas das células epiteliais do

intestino médio dos insetos susceptíveis (HOFFMANN *et al.*, 1988; HÖFTE e WHITELEY, 1989; BRAVO *et al.*, 1992; RAVOAHANGIMALALA *et al.*, 1993; PIGGOT e ELLAR, 2007; BRAVO *et al.*, 2007). Esta ligação é bifásica, composta de um passo reversível e outro irreversível (HOFFMAN *et al.*, 1988; VAN RIE *et al.*, 1989). O primeiro passo envolve a interação entre a toxina monomérica e seu sítio de união (união reversível), que é um requisito básico para que ocorra toxicidade, mas não suficiente (SCHNEPF *et al.*, 1998), então ocorre a oligomerização da toxina e a inserção na membrana, levando a formação de poros. Subsequentemente, ocorre a lise das células, rompimento do epitélio do intestino médio, germinação dos esporos, levando a uma septicemia severa e morte do inseto (DE MAAGD *et al.*, 2001; BRAVO *et al.*, 2005). As larvas infectadas por *B. thuringiensis* perdem sua agilidade e o tegumento adquire tonalidade de cor marrom-escura. Após a morte, a larva apresenta cor negra característica das infecções provocadas por este microrganismo (HABIB e ANDRADE, 1998; SOBERÓN e BRAVO, 2002).

#### **2.4 Microrganismos endofíticos**

São denominados de endofíticos todos os microrganismos capazes de colonizar, em alguma fase do seu ciclo de vida, o interior de tecidos vegetais, sem causar danos aparentes às plantas hospedeiras e sem formar estruturas externas visíveis (CAROLL, 1986; HALLMANN *et al.* 1997; AZEVEDO e ARAÚJO, 2007).

As bactérias endofíticas foram descritas no século XIX e eram consideradas inócuas às plantas. No século XX verificou-se que alguns microrganismos endofíticos, principalmente bactérias e fungos, conferiam vantagens aos seus hospedeiros, como proteção contra pragas e promoção de crescimento vegetal (HALLMANN *et al.*, 1997; AZEVEDO *et al.*, 2000; AZEVEDO *et al.*, 2002).

Tais microrganismos foram isolados de flores, frutos, folhas, caules, raízes e sementes de várias espécies vegetais e penetraram e colonizaram os espaços inter e intracelulares de diferentes tecidos vegetais como parênquima, epiderme, bainha do feixe vascular, xilema e floema e outros, de forma sistêmica ou localizada (QUADT-HALMANN *et al.*, 1997; GERMAINE *et al.*, 2004). A penetração e colonização destes microrganismos, principalmente bactérias, ocorrem pelos estômatos, ferimentos e raízes (KUKLINSKY-SOBRAL *et al.*, 2004; MENDES *et al.*, 2007). A colonização das plantas pelos microrganismos endofíticos foi detectada ocorrendo de forma piramidal, com uma quantidade decrescente de microrganismos a partir das raízes, caule e folhas. Fato este já observado em plantas cultivadas no campo com maior colonização nas áreas basais dos hospedeiros e menores nos ramos e folhas (KUKLINSKY-SOBRAL *et al.*, 2004; MENDES *et al.*, 2007).

De acordo com as estratégias de vida dos endofíticos, eles podem ser classificados em obrigatórios ou facultativos. Os obrigatórios são estritamente dependentes da planta hospedeira para seu crescimento e sobrevivência. Os facultativos por outro lado, possuem uma fase de seu ciclo dentro da planta hospedeira e outra fase fora da planta hospedeira (HARDOIM *et al.*, 2008).

Estes microrganismos podem ocorrer em muitas, senão em todas as plantas cultivadas, e sua diversidade têm sido amplamente relatada nos últimos anos em mandioca, citros, eucaliptos, batata-doce e outras. A relação entre a planta hospedeira com a comunidade endofítica envolve um processo de co-evolução regido pela sua colonização, que é influenciada pelo genótipo, estágio de crescimento, *status* fisiológico, tipo de tecido da planta, práticas agrícolas, além de condições ambientais como temperatura, água e nutrientes (HARDOIM *et al.* 2008, COMPANT *et al.* 2010, DAVITT *et al.* 2011, GUNDEL *et al.* 2011).

A composição da comunidade associada às plantas pode, ainda, ser diferente, dependendo da espécie, da cultivar, e até mesmo entre espécies transgênicas e suas respectivas progenitoras (ANDREOTE *et al.* 2010). A co-evolução das plantas com endófitos conduz a uma íntima relação, ocasionada por mudanças na informação em nível celular e molecular, que podem contribuir de diferentes formas na sanidade e desenvolvimento da planta (ARAVIND *et al.* 2010).

Dentre os microrganismos relatados como endofíticos, estão algumas espécies do gênero *Bacillus*, que foram encontradas em determinadas plantas cultivadas (AZEVEDO *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2007; BENEDUZI *et al.*, 2008). Em 2003, Monnerat e colaboradores detectaram a presença de *B. thuringiensis* em raízes de algodão (MONNERAT *et al.*, 2003). Em 2007, 482 microrganismos foram isolados de plantas de mandioca provenientes dos Estados de São Paulo, Bahia e Amazonas, dentre eles, o gênero *Bacillus* foi o que apresentou o maior número de espécies. Um dado importante deste trabalho foi a identificação de *B. thuringiensis* como bactéria endofítica (TEIXEIRA *et al.*, 2007). Além disso, outros estudos mostraram que *Bacillus* podem ser isolados de sementes e plântulas de *Eucalyptus*, e podem ser transmitidos verticalmente via semente (FERREIRA, 2008).

A associação dos microrganismos endofíticos com seus hospedeiros, na maioria das vezes, é simbiótica ou mutualística. Diversos são os benefícios atribuídos à utilização de determinadas espécies endofíticas, como proteção, produção de fitohormônios, produção de antibióticos e fixação de nitrogênio. Todos estes fatores podem direta ou indiretamente, favorecer o crescimento e desenvolvimento de mudas, resistência a nematóides e diversos patógenos, bem como a tolerância a condições ambientais e nutricionais adversas (VERMA *et al.*, 2001; STROBEL e DAISY, 2003).

Dentro do controle biológico, o uso de microrganismos endofíticos tem gerado bons resultados no controle de patógenos de plantas. Muitos endofíticos, como *Pseudomonas*

*fluorescens*, *Pantoea agglomerans*, *Acinetobacter lwoffii*, *Bacillus* sp., e outros apresentam ação fungicida e bactericida contra espécies como *Sclerotium sclerotiorum*, *S. rolfsii*, *P. syringae*, *Rhizoctonia solani*, *Ralstonia solanacearum* e outros pela produção de proteases, celulases e quitinases que degradam a parede celular ou pela produção de sideróforos (REMUSKA e PRIA, 2007, MELNICK *et al.*, 2011; BENEDUZI *et al.*, 2008).

A proteção antipatogênica mediada por endofíticos também foi observada contra os nematóides *Meloidogyne incognita*, *Helicotylenchus* spp, *Tylenchorhynchus* spp, *Radopholus similis* e *Dyctylenchus dipsaci* por *Bacillus firmus*, endófito que coloniza diversas espécies de plantas (MEJÍA *et al.*, 2008, AKHTAR e SIDDIQUI, 2008, MENDOZA e SIKORA, 2009).

O único caso de microrganismo endofítico controlando insetos-praga relatados no final do século XX foi com a espécie *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, na qual foi introduzido um gene *cryIAc* de *B. thuringiensis*. Esta bactéria transgênica foi comercializada com o nome de “Incide”, e foi utilizada para o controle da broca do milho (*Ostrinia nubilalis*). Foi verificado que a presença do gene de *B. thuringiensis* não alterou a capacidade endofítica da bactéria em colonizar milho (FAHEY *et al.*, 1991). Em 2007/2008, no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa, estudos com algodão e couve tratados com *B. thuringiensis* HD-1 demonstraram que além de colonizar estas espécies vegetais, *B. thuringiensis* podem também de forma sistêmica controlar os insetos-praga *Spodoptera frugiperda* e *P. xylostella*, respectivamente (MONNERAT *et al.*, 2009).

Até então, praticamente todas as pesquisas feitas relatavam o potencial de *Bacillus* spp. apenas no controle biológico de fitopatógenos e como produtores de hormônios de crescimento (SENTHILKUMAR *et al.*, 2007). Nenhum relato referia-se aos *Bacillus* endofíticos como agente de controle biológico de insetos-praga.

Além deste grupo da Embrapa, um grupo de pesquisa de Uganda demonstrou a colonização de *Beauveria bassiana* em banana (*Musa spp.*) e a redução da população de

*Cosmopolitus sordidus* (Coleoptera: Curculionidae), praga de grande importância na cultura da banana (AKELLO *et al.*, 2008).

Os microrganismos endofíticos podem atuar nas plantas como excelentes promotores de crescimento, sendo relatada a eficiência em plantas de cana-de-açúcar e no aumento significativo do rendimento dos grãos de arroz (BANDARA *et al.*, 2006; TING *et al.*, 2008). Trabalhos semelhantes com *Eucalyptus* demonstraram que a inoculação de bactérias endofíticas do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Stenotrophonoma* estimulou a formação de estacas, o enraizamento e a produção de biomassa radicular em *Eucalyptus globulus* (DIAS *et al.*, 2009).

Um dos principais mecanismos de promoção de crescimento das plantas mediada por microrganismos endofíticos é a produção de fitohormônios, como o ácido indol acético (AIA), giberelinas, citocininas e outros (FORCHETTI *et al.*, 2007; KANG *et al.*, 2009, PÉREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

Muitas bactérias endofíticas produzem esses hormônios, que podem auxiliar na sobrevivência da planta, principalmente em espécies que crescem sob condições de estresse, como seca e salinidade (FORCHETTI *et al.*, 2007, ARDANOV *et al.*, 2011). Dentre os microrganismos relatados como endofíticos, estão algumas espécies do gênero *Bacillus* que apresentaram AIA positivo, e que poderão ser estudados como promotores de crescimento (TEIXEIRA *et al.*, 2007, BENEDUZI *et al.*, 2008).

Além da produção de fitohormônios, as bactérias podem atuar como fixadoras biológicas de nitrogênio (FBN). Estes microrganismos utilizam o nitrogênio do ar (N<sub>2</sub>) porque possuem a capacidade de catalisar a redução do nitrogênio molecular à amônia e incorporar esse nitrogênio em suas moléculas orgânicas (aminoácidos e proteínas). As plantas absorvem nitrogênio presente na atmosfera na forma de amônia e nitrato, porém tal absorção é ínfima, sendo necessária a suplementação com fertilizantes, com custos elevados para a agricultura.

Desta forma a fixação biológica de nitrogênio aparece como uma alternativa economicamente viável e menos impactante (GOVINDARAJAN *et al.*, 2007). Como alternativa, aparecem os microrganismos endofíticos que ao colonizarem raízes, caules e folhas das plantas, sofrem menos competição do que as bactérias presentes no solo e disponibilizam parte do nitrogênio por eles fixado diretamente para a planta. São vários os microrganismos fixadores de nitrogênio, podendo-se citar *Gluconacetobacter*, *Hesbaspirillum*, *Burkholderia*, *Rhizobium* e outros (BALACHANDAR *et al.*, 2006).

Os fixadores de N<sub>2</sub>, também, estão presentes entre os bacilos isolados de solos brasileiros, alguns deles de solos do cerrado. Um grupo de pesquisadores do IM-UFRJ isolou e caracterizou bacilos fixadores de N<sub>2</sub>, alguns deles foram identificados como *Bacillus polymyxa*; outros nomeados *Bacillus azotofixans* (DROZDOWICZ *et al.*, 1997). Uma das finalidades da pesquisa foi buscar marcas genéticas para futura aplicação em experimentos sobre recombinantes e um novo plasmídeo foi identificado pela primeira vez em *B. polymyxa* (SELDIN *et al.*, 1984; ROSADO e SELDIN, 1993). Em algumas bactérias deste gênero foram detectados atividade da enzima nitrogenase em várias espécies, tais como *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. brevis* e *B. firmus*. Em 2003, outro trabalho mostrou o isolamento de 14 linhagens de *Bacillus* capazes de fixar N<sub>2</sub>, em lavouras de oito localidades no Rio Yangtze, China (XIE *et al.*, 1998, 2003). Em 2005, foi demonstrada pela primeira vez a fixação de nitrogênio ocorria em *Bacillus marisflavi* e *Paenibacillus massiliensis* e à presença de gene *nif* no genoma de ambas as espécies (DING *et al.*, 2005).

A capacidade de fixar nitrogênio é determinada pelo complexo enzimático da nitrogenase e as bactérias que possuem este complexo são chamadas diazotróficas (NEWTON, 2000). Estes microrganismos representam grande benefício para a agricultura nacional. A produção de soja no Brasil é um exemplo da eficiência da FBN e com o processo



de inoculação são economizados R\$ 660,00/ha. Considerando que 23,5 milhões de hectares são plantados com soja no Brasil, a economia proporcionada pela não utilização de adubos nitrogenados é da ordem de R\$ 15,5 bilhões, algo em torno de US\$ 9 bilhões de dólares (MENDES *et al.*, 2012). Os benefícios da fixação biológica são imensos, pois a economia na utilização de adubos nitrogenados diminui as perdas por lixiviação que podem resultar no acúmulo de formas nitrogenadas, particularmente nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nas águas de rios, lagos e aquíferos subterrâneos que atingem níveis tóxicos aos peixes e ao homem. Essa redução poderia evitar diversas doenças como câncer e problemas respiratórios que têm sido associadas ao consumo de águas contaminadas com nitrato e diminuiria o processo de desnitrificação, ou seja, a transformação do  $\text{NO}_3^-$  proveniente do fertilizante, em formas gasosas, como NO (óxido nitroso) e  $\text{N}_2\text{O}$  (óxido nítrico), que contribuem para a diminuição da camada de ozônio agravando o efeito estufa tão relacionado às mudanças climáticas globais (MENDES *et al.*, 2012). Ao substituir o uso de adubos nitrogenados na cultura da soja, a FBN influencia positivamente a qualidade do solo por evitar todos esses problemas relacionados à poluição causada por estes adubos. Além disso, o processo industrial que transforma o nitrogênio atmosférico em  $\text{NH}_3$  (amônia) demanda por volta de seis barris de petróleo por tonelada de nitrogênio produzido, implicando em grandes quantidades de gás carbônico liberadas para atmosfera no momento da produção do adubo nitrogenado (MENDES *et al.*, 2012).

Depois do nitrogênio, o fósforo é o nutriente que mais limita o crescimento das plantas e sua deficiência restringe o rendimento das culturas. A razão deste fato é que no Brasil, os solos são predominantemente ácidos e normalmente deficientes em fósforo. Organismos com habilidade de solubilizar fosfato representam uma alternativa economicamente viável, pois a comunidade microbiana é capaz de disponibilizar nutrientes de reservas naturais e enriquecer o solo (DIAS *et al.*, 2009). Estudos com *Bacillus firmus* e *Paenibacillus polymyxa*

comprovaram o aumento da captação de fósforo e na produção em lavouras de arroz e trigo, respectivamente, depois da inoculação destas bactérias (GAUR e OSTWAL, 1972, DATTA *et al.*, 1982). Assim, algumas espécies como *Bacillus pumillus* e *Acinetobacter calcoaceticus* são bactérias conhecidamente endofíticas que auxiliam a planta hospedeira com oferta de fósforo através de sua solubilização (KANG *et al.*, 2009; PÉREZ-GARCÍA *et al.*, 2011). O principal mecanismo envolvido na solubilização de fósforo é a produção e liberação de ácidos pelas bactérias, sendo os ácidos lácticos, itacónico, isovalérico, isobutírico e acético, os mais descritos na literatura (VASQUEZ *et al.*, 2000; DIAS *et al.*, 2009).

Além da solubilização de minerais como fósforo, as bactérias promotoras de crescimento são capazes de fornecer à planta ferro (Fe) suficiente em solos com limitação desse composto (GLICK, 1995). O ferro é um dos minerais mais abundantes na Terra, é na maior parte das vezes encontrado na forma de  $Fe^{+3}$ , com uma solubilidade extremamente baixa. Para superar este problema, estes microrganismos podem produzir e secretar moléculas de baixo peso molecular que se ligam ao ferro com uma alta afinidade, denominadas de sideróforos (GRAY e SMITH, 2005). Essa ligação também impede a proliferação de patógenos. Além disso, algumas plantas podem capturar o complexo ferro-sideróforo bacteriano, transportando-os para dentro das células, onde o ferro é liberado do sideróforo e fica disponível para a planta (CROWLEY *et al.*, 1988).

Trabalhos com *B. thuringiensis* como endofítico e promotor de crescimento são praticamente inexistentes. Como esta espécie de *Bacillus* é conhecida como um importante agente de controle biológico de pragas, e que pode atuar como microrganismo endofítico, abre-se uma nova perspectiva potencial de sua utilização tanto no controle sistêmico de insetos-praga como na promoção do crescimento de plantas de interesse agrícola. Esta nova estratégia poderá reduzir algumas desvantagens na utilização de *B. thuringiensis* como sua sensibilidade aos raios ultravioletas e a lavagem pela chuva.

Deve-se, então, aprofundar as pesquisas sobre a interação entre *B. thuringiensis* endofítico, plantas cultivadas e insetos-praga, o perfil e as estratégias naturais de colonização e permanência destes microrganismos no interior das plantas e seu efeito promotor de crescimento, assunto, ainda pouco conhecido.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Selecionar estirpes de *B. thuringiensis* efetivas contra *P. xylostella*, compreender os mecanismos de absorção destas estirpes de *B. thuringiensis* em repolho, determinar os padrões de colonização e avaliar o efeito sobre o desenvolvimento das plantas de repolho viabilizando a sua utilização sistêmica.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Determinar a toxicidade de três estirpes de *B. thuringiensis* a *P. xylostella* e realizar a caracterização bioquímica, molecular e ultraestrutural dessas estirpes;
- Avaliar o padrão de colonização das estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a *P. xylostella* em diferentes híbridos de repolho;
- Avaliar o efeito das estirpes de *B. thuringiensis* sobre a germinação e o desenvolvimento das plântulas de repolho *in vitro*, os possíveis mecanismos de ação e a ação endofítica sobre larvas de *P. xylostella*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABH. **Associação Brasileira de Horticultura.** Disponível em: <<http://www.abhorticultura.com.br/News/Default.asp?id=1673>>. Acesso em: 7 de fev. 2008
- ADANG, M., STAVAR, M. J.; ROCHELEAU, T. A.; LEIGHTON, J.; BARKER, R. F.; THOMPSON, D. V. Characterized fulllength and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. **Gene**, v. 36, p. 289-300, 1985.
- ANDREOTE, F.D., ROCHA, U.N., ARAÚJO, W.L., AZEVEDO, J.L. & OVERBEEK, L.S. van. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, p. 389-399, 2010.
- AKELLO, J.; DUBOIS, T.; COYNE, D.; KYAMANYWA, S. Effect of endophytic *Beauveria bassiana* on populations of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, and their damage in tissue-cultured banana plants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 129, p. 157-165, 2008.
- AKHTAR, M.S.; SIDDIQUI, Z.A. *Glomus intraradices*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Bacillus pumilus*: effective agents for the control of root-rot disease complex of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Journal of General Plant Pathology**, v. 74, p. 53-60, 2008.
- ANGUS, T. A. The use of *Bacillus thuringiensis* as a microbial insecticide. **World Review of Pest Control**, v. 7, p. 1-26. 1968.
- ARAGÃO, F. A. S. DE.; FEITOSA, F. A. A.; MORAES, C. A. P.; CORREA, M. C. DE M. **Sistema de produção de repolho utilizando TNT como mulching e manta.** Disponível em: <[http://www.cnpat.embrapa.br/sbsp/anais/Trab\\_Format\\_PDF/237.pdf](http://www.cnpat.embrapa.br/sbsp/anais/Trab_Format_PDF/237.pdf)>. Acesso em: 25 set. 2009.

ARAVIND, R., EAPEN, S.J., KUMAR, A., DINU, A.; RAMANA, K.V. Screening of endophytic bacteria and evaluation of selected isolates for suppression of burrowing nematode (*Radopholus similis* Thorne) using three varieties of black pepper (*Piper nigrum* L.). **Crop Protection**, v. 29, p. 318-324, 2010.

ARDANOV, P., OVCHARENKO, L., ZAETS, I., KOZYROVSKA, N. & PIRTTILÄ, A.M. Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Biological Control**, v. 56, p. 43-49. 2011.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plant. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K.; (Eds.) **Fungi: Multifaceted Microbes**, New Delhi: Anamaya Publishers, 2007. chap.6, p. 189-207.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. **Microorganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais**. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. *Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. Caxias do Sul: EDUCS, p. 235-268, 2002.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JÚNIOR., W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advantages on tropical plants. **Environmental Biotechnology**, v. 3, n.1, 31 p., 2000.

BAEKA, J.H.; KIMA, J.I.; LEEA, D.W.; CHUNGB, B.K.; MIYATAC, T.; LEEA, S.H. Identification and characterization of ace1-type acetylcholinesterase likely associated with organophosphate resistance in *Plutella xylostella*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Orlando, v.81, p.164 -175, 2005.

BALACHANDAR, D., SANDHIYA, G.S., SUGITHA, T.C.K.; KUMAR, K. 2006 Flavonoids and growth hormones influence endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 707-712, 2006.

BANDARA, W.M.M.S.; SENEVIRATNE, G.; KULASOORIYA, S.A. 2006. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal of Bioscience**, v. 31, p. 645-650, 2006.

BAUM, J.A.; JOHNSON, T.B.; CARLTON, B.C. *Bacillus thuringiensis*: Natural and recombinant bioinsecticide products. **Methods Biotechnology**, v. 5, 189–209, 1999.

BEARD, C.E.; COURT, L.; MOURANT, R.G.; JAMES, B.; VAN RIE, J.; MASSON, L.; AKHURST, R. J. Use of a Cry1Ac-resistant line of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to detect novel insecticidal toxin genes in *Bacillus thuringiensis*. **Journal Current Microbiology**, v. 57, n. 3, 175-180, 2008.

BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L. K.; ZANETTINI, M. H.; PASSAGLIA, L. Evaluation of genetic diversity and PGPR activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 39, p. 311-320, 2008.

BERLINER, E. Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe. Z. **Gesante Getreidewesen**, Berlin, v. 3, p. 63-70, 1911.

BERLINER, E. Eber die schlaffsucht der Mehlmottenraupe. (Ephesis kuehniella Zell.) undihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n. sp. Z. ang. **Entomology**, v. 2, p. 29-56, 1915.

BIOCONTROLE – **Métodos de controle de pragas**. Disponível em: <[http://www.biocontrole.com.br/pragas/praga.php?id=plutella\\_xylostella](http://www.biocontrole.com.br/pragas/praga.php?id=plutella_xylostella)> Acesso em: 20 abr. 2012.

BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 843-850. 2003

BOURGOUIN, C.; DELÉCLUSE, A.; RIBIER, J.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. A *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* gene encoding a 125-kilodalton larvicidal polypeptide is

associated with inverted repeat sequences. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 3575-3583, 1988.

BRADLEY, D.; HARKEY, M. A.; KIM, M.-K.; BREVER, D.; BAUER, L. S. The insecticidal CryIB protein of *Bacillus thuringiensis* spp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, California, v. 65, p. 162-173, 1995.

BRAVO, A., GILL, S. S.; SOBERON, M. ***Bacillus thuringiensis* mechanisms and use**. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. (eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 6, Elsevier, New York, NY, USA. 2005, p. 175-206.

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, n. 4, p. 423 – 435. 2007.

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.; JANSENS, S.; PEFEROEN, M. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, p. 237-246, 1992.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S. SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry**, v. 41, n.7, 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 Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n.12, p. 4965-4972, 1998.

CARROLL, G. C. The biology of endophytism in plants with particular reference to Woody perennials. In: FOKKEMA, N. J.; HEUVEL, J. VAN DEN, Eds. **Microbiology of Phyllosphere**, London: Cambridge University Press: p. 205-222, 1986.

CASTELO BRANCO, M., FRANÇA, F. H.; MEDEIROS, M. A.; LEAL, J. G. T. Uso de inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e traça-das-crucíferas: um estudo de caso. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 9, p. 60-63, 2001.

CASTELO BRANCO M.; FRANÇA, F. H.; PONTES, L. A.; AMARAL, P. S. Avaliação da suscetibilidade a inseticidas de populações da traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 549-552, 2003.

CASTELO BRANCO, M.; GATEHOUSE, A. G. Insecticide resistance in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the Federal District, Brazil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, p. 75-79, 1997.

CASTELO BRANCO, M.; MEDEIROS, M.A. Impacto de inseticidas sobre parasitóides de traça-das-crucíferas em repolho no Distrito Federal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 7-13, 2001.

CASTELO BRANCO, M.; MELO, C. A Resistência a abamectin e cartap em populações de traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 541-543, 2002.

CASTELO BRANCO, M; VILLAS BOAS, G. L.; FRANÇA, F. H. Nível de dano da traça-das-crucíferas em repolho. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 154-157, 1996.

CHAMBERS, J.A., JELEN, A., GILBERT, M.P., JANY, C.S., JOHNSON, T.B., GAWRON-BURKE, C. Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 3966–3976, 1991.



CHEN, C.; CHANG, S.; CHENG, L.; HOU, R. F. Deterrent effect of the chinaberry extract on oviposition of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lep. Yponomeutidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.120, p.165-169, 1996.

COMPANT, S., CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth--promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v.42, p. 669-678, 2010.

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/](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/). Acesso em: 20 nov. 2007.

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/](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/). Acesso em: 26 mai. 2012.

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

DANKOCSIK, C.; DONOVAN, W. P.; IANY, C. S. Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. **Molecular Microbiology**, v. 4, p. 12, 2087-2094, 1990.

DATTA, M.; BANISH, S.; DUPTA, R. K. Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy in acid soils of Nagaland. **Plant Soil**, v. 69, p. 365-373, 1982.

DAVITT, A. J., CHEN, C.; RUDGERS, J. A. Understanding context-dependency in plant-microbe symbiosis: The influence of abiotic and biotic contexts on host fitness and the rate of symbiont transmission. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 137-145, 2011.

DE MAAGD, R. A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v.4, p.9-13, 1999.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has involved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v.17, n.4, p. 193-199, 2001.

DE MAAGD, R. A., WEEMEN-HENDRIKS, M., MOLTHOFF, J.W.; NAIMOV, S. Activity of wild-type and hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins against *Agrotis ipsilon*. **Archives of Microbiology**. v. 179, p. 363-367, 2003.

DEVINE, G.J.; FURLONG, M.J. Insecticide use: contexts and ecological consequences. **Agriculture and Human Values**, v. 24, p. 281-306, 2007.

DIAS, A.C.F., COSTA, F.E.C., ANDREOTE, F.D., LACAVA, P.T., TEIXEIRA, M.A., ASSUMPCÃO, L.C., ARAÚJO, W.L., AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 25, p. 189-195, 2009.

DING, Y.; WANG, J., LIU, Y., CHEN, S. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. **Journal of Applied Microbiology**, Berlin, v. 99, n. 5, p. 1271-1281, 2005.

DROZDOWICZ, A. Bactérias de solo. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos Solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa/CPAC, 1997, p. 17-66.

EDWARDS, D. L.; PAYNE, J.; SOARES, G. G. Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. **European Patent Application** EP O 303 426 A2, 1988.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; GRAIG, 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**, USA, v. 93, p. 5389-5394, 1996.

FAHEY, J. W.; DIMOCK, M. B.; TOMASINO, S. F.; TAYLOR, J. M.; CARLSON, P. S. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: a case study in industry. In: **Microbial Ecology of Leaves**. New Cork: Springer – Verlag, 1991, p. 401-411.

FEITELSON, J. S. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In: **Proceedings of XXVII Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology**, Montpellier, France, 1994. p.184.

FERREIRA, A. **Interação entre bactérias endofíticas e do rizoplasma com *Eucalyptus***. Piracicaba. Escola Superior de agricultura Luis de Queiroz, 2008. 77 p. Dissertação de Mestrado.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, 402 p, 2000.

FORCHETTI, G.; MASCIARELLI, O.; ALEMANO, S.; ALVAREZ, D.; ABDALA G. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 76, p. 1145-1152,

FRANÇA, F.H.; MEDEIROS, M.A. Impacto de combinação de inseticidas sobre a produção de repolho e parasitóides associados com a traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.16, n.2, p.132-135, 1998.

FRANÇA, F. H., GIORDANO, L. DE B.; SILVA, N. CASTELO BRANCO, M. RESENDE, AM. Avaliação de germoplasma de repolho visando resistência a *Plutella xylostella* (L.). **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 3, n. 1, p. 65-71, 1985.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; DE BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 920 p, 2002.

GAUR, A. C.; OSTWAL, K. P. Influence of phosphate dissolving bacilli on yield and phosphate uptake of wheat crop. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 10, p. 393-394, 1972.

GERMAINE, K.; KEOGH, E.; BORREMANS, B.; VAN DER LELIE, D.; BARAC, J.; OEYEN, L.; VANGRONSVELD, J.; MOORE, F. P.; MOORE, E. R. B., CAMPBELL, C.D.; RYAN, D.; DOWLING, D. N. Colonisation of poplar trees by g fp expressing bacterial endophytes. **FEMS Microbiology and Ecology**, v. 48, p. 109-118. 2004.

GILLILAND, A., CHAMBERS, C.E, BONE, E.J, ELLAR, D.J. Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1 endotoxin binding in determining potency during Lepidopteran larval development. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p.1509–1515, 2002.

GLICK B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Canadian, v. 41, p.109–117, 1995.

GODIN, C.; BOIVIN, G. Seasonal occurrence of lepidopterous pests of cruciferous crops in Southwestern Quebec in relation to degree-day accumulations. **Canadian Entomology**, v. 130, p. 173-185, 1998.

GOVINDARAJAN, M., KWON, S.W. & WEON, H.Y. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 997-1006, 2007.

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

GUNDEL, P.E., GARIBALDI, L.A., MARTÍNEZ-GHERSA, M.A.; GHERSA, C.M. *Neotyphodium* endophyte transmission to *Lolium multiflorum* seeds depends on the host plant fitness. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 359-366, 2011.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: **Controle microbiano de insetos**. Ed. ALVES, S.B., FEALQ, Piracicaba, p. 383-446, 1998.

HAIDER, M. Z.; ELLAR, D. J. Analysis of the molecular basis of insecticidal specificity of *Bacillus thuringiensis* crystal  $\delta$ -endotoxin. **Biochemistry Journal**, v. 248, p. 197-201, 1987.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HANNAY, C. L. Crystalline inclusions in aerobic spore forming bacteria. **Nature**, London, v. 172, p. 1004, 1953.

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.

HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends Microbiology**, v. 16, p. 463-471, 2008.

HARDY, J. E. *Plutella maculipennis* Curt., its natural and biological control in England. **Bull. Entomology Research**, v. 29, p. 343-372. 1938

HARCOURT, D.G. Biology of cabbage caterpillars in eastern Ontario. **Proceedings of the Entomological Society Ontario**, v. 93, p. 61-75, 1962.

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.

HOFFMANN, C., VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, J.; VAN RIE, J.; JANSSENS, H.; VAN RIE, J.; MELLAERT, J. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect

midguts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 85, p. 7844-7848, 1988.

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

IMENES, S. D. L.; CAMPOS, T. B. de.; RODRIGUES NETTO, S. M.; BERGMANN, E. C. Avaliação da atratividade de feromônio sexual sintético da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), em cultivo orgânico de repolho. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.1, p.81-84, 2002.

ISHIWATA, S. On a kind of severe flacherie (sotto disease). **Danihon Sanshi Kaiho**, v.114, p. 1-5, 1901.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops**. ISAAA Brief No. 41. ISAAA, Ithaca, New York. 2009.

KANG, S.M., JOO, G.J., HAMAYUN, M., NA, C.I., SHIN, D.H., KIM, H.Y., HONG, J.K. & LEE, I.J. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. **Biotechnology Letters**, v.31, p. 277- 281, 2009.

KALMAN, S.; KIEHNE, J. L.; LIBS, J. L.; YAMAMOTO, T. Cloning of a novel *cry1C* type gene from a strain of *B. thuringiensis* subsp *galleriae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 04, p. 1131-1137, 1993.

KANG, S.M., JOO, G.J., HAMAYUN, M., NA, C.I., SHIN, D.H., KIM, H.Y., HONG, J.K. & LEE, I.J. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 277- 281, 2009.

KIMOTO, T. **Nutrição e adubação de repolho, couve-flor e brócolo.** In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO E ADUBAÇÃO DE HORTALIÇAS, 1993, Piracicaba, Anais... Piracicaba: ESALQ, p. 149-177. 1993.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. **Advances Insect Physiology**, v. 24, p. 275-308, 1994.

KOO, B.T., PARK, S.H., CHOI, S.K., SHIN, B.S., KIM, J.I.; YU, J.H. Cloning of a novel crystal protein gene cry1K from *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 134 n. 2-3, p. 159-164, 1995.

KUKLINSKY-SOBRAL J, ARAÚJO WL, MENDES R, GERALDI IO, ET AL. Isolation and characterization of soybean-associated Bacteria and their potential for plant growth. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

KRYWUNCZYK, J.; FAST, P. G. Sorological relationships of the crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 36, p. 139-140, 1980.

LERECLUS, D.; BOURGOUIN, C.; LECADET, M. M.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal d-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: Issar Smith, R.; Slepecky, A.; Setlow, P., Ed. **Regulation of procaryotic development**. Washington: American Society for Microbiology, 1989, p. 71-88.

LOGUERCIO, L. L.; SANTOS, C. G.; BARRETO, M. R.; GUIMARAES, C. T.; PAIVA, E. Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a *cry* constitution with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 362-367, 2001.

MARGALITH, Y.; BEN-DOV, E. **Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.** In: Insect Pest Management: Techniques for Environmental Protection, Eds. REHCIGL, J. E.; REHCIG, N. A. Boca Raton, CRC Press. 2000. p. 243–301.

MARTINS, E. S.; AGUIAR, R. W. D. S.; MARTINS, N. F.; MELATTI, V. M.; FALCÃO, R.; GOMES, A.C.M.M. ; RIBEIRO B. M.; MONNERAT, R. G. Recombinant CryIIa protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis Boheman*) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1363–1371, 2008.

MARTINS, E.S.; MONNERAT, R.G.; QUEIROZ, P.R.; DUMAS, V.F.; BRAZ, S.V.; DE SOUZA AGUIAR, R.W.; GOMES, A.C.; SÁNCHEZ, J.; BRAVO, A.; RIBEIRO, B.M. Midgut GPI-anchored proteins with alkaline phosphatase activity from the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) are putative receptors for the Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 2, p. 138-45. 2010.

MASSON, L., ERLANDSON, M. PUZSTAI-CAREY, M. BROUSSEAU, R.; JUÁREZ-PÉREZ, V.; FRUTOS, R. A holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4782-4788. 1998.

MAU, R. L.; KESSING, J. L. M. *Plutella xylostella*. 2007. Disponível em <http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/plutella.htm>. Acesso 5 mar. 2012.

MEJÍA, L.C., ROJAS, E.I., MAYNARD, Z., BAEL, S. van, ARNOLD, A.E., HEBBAR, P., SAMUELS, G.J., ROBBINS, N.; HERRE, E.A. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, v. 46, p. 4-14, 2008.

MELNICK, R.L., SUÁREZ, C., BAILEY, B.A.; BACKMAN, P.A. Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. **Biological Control**, v. 57, p. 236-245. 2011.

MELO, P. E.; CASTELO BRANCO, M.; MADEIRA, N. R. 1994. Avaliação de genótipos de repolho para a resistência à traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 12, p. 19-24. 1994.



MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAUJO, W. L.; RAAIJMAKERS, J. M. Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7259-7267, 2007.

MENDES, I.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F., BUENO, F. **Fixação Biológica do nitrogênio na soja – bom para a qualidade do solo, para o bolso do agricultor e para o Brasil**. Disponível em: <http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias>. Acesso 23 mar. 2012.

MENDOZA, A.R.; SIKORA, R.A. Biological control of *Radopholussimilis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. **BioControl**, v. 54, p. 263-272, 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Agrofit on line**. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/html/agrofit.htm> >. Acesso em: abr. 2012.

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

MONNERAT, R.G.; KIRK, A.A.; BORDAT, D. Biology of *Diadegma* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae), a parasitoid of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae), from Reunion Island. **Neotropical Entomology**, v. 3, n. 2, p. 271- 274. 2002.

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, 4p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Comunicado técnico, 98), 2003.

MONNERAT, R.G.; SILVA, S.F.; SIVA-WERNECK, J.O. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 65p. 2001.

MONNERAT, R. G. ; SOARES, C. M. S. ; GOMES, A. C. M. ; JONES, G.; MARTINS, E. ; PRAÇA, L.; BERRY, C. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* bacteria living inside of plants. **Microbial Biotechnology**, v. 2, p. 1560-1562, 2009.

NEWTON, W. E. N. Nitrogen fixation in perspective. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W.E. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Foz do Iguaçu: Kluwer Academic Publishers, p 3-8, 2000.

NOGUERA, P.A.; IBARRA, J.E. Detection of New cry Genes of *Bacillus thuringiensis* by Use of a Novel PCR Primer System. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76 , n. 18, p. 6150-6155, 2010

OMOLO, E. O., M. D. JAMES, E. O. OSIR, AND J. A. THOMSON. Cloning and expression of a *Bacillus thuringiensis* (L1-2) gene encoding a crystal protein active against *Glossina morsitans morsitans* and *Chilo partellus*. **Current Microbiology**, v. 34, p. 118-121. 1997.

PÉREZ-GARCÍA, A., ROMERO, D.; VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current opinion in biotechnology**, v. 22, p. 187-193, 2011.

PIGGOT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 71, n. 2, p. 255-281. 2007.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. DE S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 11-16. 2004.

PRACA, L. B.; RAMOS, F. R.; RAMOS, F. R.; WAGNER, F. O.; SOARES, C. M. S.; SUJII, E.; MONNERAT, R.G. Suscetibilidade da traça-das-crucíferas a *Bacillus thuringiensis* em repolho no Distrito Federal. **Universitas**. Ciências da Saúde (UNICEUB. Impresso), v. 8, p. 17-31, 2010.

QUADT-HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, 43, p. 577-582, 1997.

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.

RAVOAHANGIMALALA, O.; CHARLES, J. F.; SCHOELLER-RACCAUD, Y. J. Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* toxin in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). **Research in Microbiology**, Montpellier, v. 44, p. 271-278, 1993

RAYMOND, B., JOHNSTON, P. R., NIELSEN-LEROUX, C., LERECLUS, D.; CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 189-194. 2010.

REMUSKA, A. C.; PRIA, M. D. Effect of *Bacillus thuringiensis* and *Trichoderma* sp. on the growth pathogenic fungi. **Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, v. 13, n. 3, p. 31-36, 2007

ROSADO, A. S.; SELDIN, L. Production of a potentially novel anti-microbial substance by *Bacillus polymyxa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 521-528, 1993.

ROSAS-GARCÍA, N.M.; MIRELES-MARTÍNEZ<sup>1</sup>, M.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, J.L.; IBARRA, J.E. Screening of cry gene contents of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from

avocado orchards in Mexico, and their insecticidal activity towards *Argyrotaenia* sp. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p. 224–230, 2008.

SANTOS, J. R.; NUNES, M. U. C.; SOUZA, R. A. de.; SOUZA, I. M. de; TAVARES, F. A.; SOUZA, F. H. O. **Desenvolvimento de mudas de repolho sob o efeito de fertilizantes de solubilidade lenta**. Encontro Nacional sobre Substratos para Plantas Materiais Regionais como substrato, 2008. CE - Realização: Embrapa Agroindústria Tropical, SEBRAE/CE e UFC. Disponível em [http://www.cnpat.embrapa.br/viensub/Trab\\_PDF/sub\\_33.pdf](http://www.cnpat.embrapa.br/viensub/Trab_PDF/sub_33.pdf)>. Acesso em 5 out 2009.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 62, p. 775-806. 1998.

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., MADHAIYAN, M., SUNDARAM, S.P., SANGEETHA, H. & KANNAIYAN, S. Induction of endophytic colonization in rice (*Oryza sativa* L.) tissue culture plants by *Azorhizobium caulinodans*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1477-1487, 2008.

SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. Disponível em: <<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap12/>>. Acesso em: 20 jul. 2002.

SILVA, A.L.; VELOSO, V.R.S.; TARDIVO, J.C.; ABREU, C.D.; SILVA, R.M.C. Avaliação de inseticidas piretróides no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* (L., 1758) em repolho. **Anais das Escolas de Agronomia e Veterinária**, v. 23, n. 1, p. 7-12, 1993.

SILVA-FILHO, M.C.; FALCO, M.C. Interação planta-inseto: adaptação dos insetos aos inibidores de proteinase produzidos pelas plantas. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 2, n. 12, 38-42, 2000.

SMITH, G. P.; MERRICK, J. D.; BONE, E. J.; ELLAR, D. J. Mosquitocidal activity of the CryIC  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 680-684, 1996.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products microbiol. **Microbiology and Molecular Biology Review**, Washington, v. 67, p. 491-502, 2003.

TALEKAR, N. S.; SHELTON, A. M.. Biology, ecology and management of the diamondback moth. **Annual Review of Entomology**. v. 38, p. 273-301, 1993.

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

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S. DE.; VIEIRA, R. F.. COSTA, F. E. C.; HARAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1, p. 43-49, 2007.

TING, A.S.Y., MEON, S., KADIR, J., RADU, S.; SINGH, G. Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. **BioControl**, v. 53, p. 541-553, 2008.

TORRES, A.L.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; MEDEIROS, C. A. M.; BARROS, R. Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. **Bragantia**, v.65, n.3, p. 447-457, 2006.

ULMER, B.; GILLOTT, C.; WOODS, D.; ERLANDSON, M. Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), feeding and oviposition preferences on glossy and waxy *Brassica rapa* (L.) lines. **Crop Protection**, v. 21, p. 327-331, 2002.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SHILER, W.; DE-SOUZA, M. T. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: **Controle biológico**. Eds. MELO, I.S; AZEVEDO, J. L. Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, v. 1, p. 201-230, 1998.

VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; HÖFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. **European Journal of Biochemistry**, v. 186, p. 239-247, 1989.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M. E.; LOPEZ-CORTES, A.; BASHAN, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, p. 460-468, 2000.

VASQUEZ, B.L. 1995. Resistance to most insecticides. In T.J. Walker (ed.), University of Florida of Insect Records. Chapter 15: **Resistant to Most Insecticides**: Department of Entomology and Nematology. University of Florida, Gainesville. Disponível em: <<http://ufbir.ifas.ufl.edu/chap15.htm>>. Acesso em: 07 jul. 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.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 549-576. 1986.

WEISER, J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Ssoviet Union. In: Krieg, A. ; Huger, A. M. **Mitteilungen aus der Biologischen**

**Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem Heft**, 233, p. 37-50, Paul Parey, Berlin. 1986.

WU, D.; CAO, X. L.; BAI, Y. Y.; ARONSON, A. I. Sequence of an operon containing a novel delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 65, n. 1, p. 31-35, 1991.

XIE, G. H.; CAI, M. Y.; GUANG, C. T.; Steinberg, Y. Cultivable heterotrophic N<sub>2</sub> fixing bacterial diversity in rice fields in the YangTze River plain. **Biology and fertility of soils**, v. 37, p. 29-38, 2003.

XIE, G. H.; SU, B. L.; CUI, Z. S. Isolation and identification of N<sub>2</sub> fixing strains of *Bacillus* in rice rhizosphere of YangTze River Valley. **Acta Microbiology**, v. 38, p. 480-483, 1998.

ZHENG, J.; SUTTON, J. C.; YU, H. Interactions among *Pythium* HENG,A., ZHU,J., TAN,F., GUAN,P., YU,X., WANG,S., DENG,Q., LI,S., LIU,H. AND LI,P. Characterisation and expression of a novel haplotype cry2A-type gene from *Bacillus thuringiensis* strain JF19-2. **Journal of Annals Microbiology**, v. 60, p. 129-134, 2010.

# CAPÍTULO I

## SELEÇÃO DE ESTIRPES BRASILEIRAS DE *Bacillus* *thuringiensis* TÓXICAS A *Plutella xylostella*



## SELEÇÃO DE ESTIRPES BRASILEIRAS DE *Bacillus thuringiensis* TÓXICAS A *Plutella xylostella*

### RESUMO

*Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutelidae) é uma praga de grande importância econômica, devido aos danos provocados em cultivos de brássicas em todo o mundo. O controle desta praga é dificultado pela seleção de populações de insetos resistentes a vários inseticidas e pelo seu hábito críptico entre as folhas na cabeça do repolho. A utilização de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para controle dessa praga depende da seleção de estirpes com elevada eficiência contra o inseto-alvo associada a métodos de aplicação que aperfeiçoem a ação da bactéria. Este trabalho teve como objetivo selecionar e caracterizar estirpes brasileiras de *B. thuringiensis* tóxicas a *P. xylostella*, pertencentes ao Banco de Bactérias de Invertebrados da Embrapa quanto ao perfil proteico, molecular e morfológico. As estirpes S1905, S2122 e S2124 foram apresentaram toxicidade a traça e valores de CL<sub>50</sub> semelhantes entre si. S1905 e S2124 apresentaram duas proteínas principais de 130 e 65 kDa, e a S2122 apresentou apenas a proteína de 130 kDa. Observou-se a presença de fragmentos de DNA de tamanho esperado para a detecção de diferentes genes *cry1* e *cry2* específicos e cristais bipiramidais, cubóides e redondos. Os diferentes genes encontrados nas estirpes estudadas são de grande importância para o manejo da resistência de *P. xylostella* aos produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* existentes no mercado.

**Palavras-chave:** Controle Biológico, toxicidade, genes *cry*

## **SELECTION OF BRAZILIAN STRAINS OF *Bacillus thuringiensis* TOXIC TO *Plutella xylostella***

### **ABSTRACT**

*Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) is an important economic pest of brassica crops worldwide. The control of this pest is hindered by the selection of insect resistant populations to various insecticides and by his cryptic habit between the leaves of the cabbage head. The use of *Bacillus thuringiensis* (Bt) for endophytical control of the pest depends on the selection of strains high virulent against the target insect. This work aimed to select and characterize Brazilian strains of *B. thuringiensis* toxic to *P. xylostella*, belonging to the Invertebrate Pathogenic Bacteria Culture Collection of Embrapa. Strains S1905, S2122 and S2124 were highly toxic to larvae and LC50 values were similar. S1905 and S2124 showed two major proteins of 130 and 65 kDa, and S2122 showed only the protein of 130 kDa. It was observed the presence of DNA fragments of the expected size for the detection of various specific *cry1* and *cry2* genes and bipyramidal, cuboidal and round crystals. The different specific genes found are very important to develop new products with different toxins to be used in management of *P. xylostella* resistant to *B. thuringiensis*.

**Key words: Biological control, toxicity, *cry* genes**

## 1 INTRODUÇÃO

*Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), conhecida popularmente como traça-das-crucíferas, é uma praga causadora de elevados prejuízos em brássicas, principalmente na cultura do repolho (*Brassica oleraceae* var. *capitata*), tanto no Brasil quanto em outros países produtores, podendo ocasionar reduções de até 60% na produção (CASTELO BRANCO *et al.*, 1996; FRANÇA e MEDEIROS, 1999; IMENES *et al.*, 2002).

Na região central do Brasil, o ataque de *P. xylostella* no campo ocorre durante todo o ano, mas sua maior ocorrência acontece de julho a setembro, principalmente na formação da cabeça do repolho, aproximadamente entre quatro a sete semanas após o transplante das mudas (CASTELO BRANCO *et al.*, 2003).

A principal forma de controle no Brasil tem sido realizada através da utilização de inseticidas químicos, havendo relatos de até quatro aplicações por semana com redução satisfatória dos danos do inseto (VILLAS BOAS *et al.*, 2004). No entanto, esta prática tem levado à seleção de populações de insetos resistentes, principalmente onde o cultivo de repolho é ininterrupto (BAEKA *et al.*, 2005; PRAÇA *et al.*, 2010). A utilização deste tipo de controle de forma inadequada pode resultar em consequências graves ao homem e ao meio ambiente. Há, portanto, a necessidade de se reduzir o consumo dos agrotóxicos através do emprego de formas de controle mais seguras.

Os métodos biológicos são uma alternativa ao controle químico e bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* e se destacam como os mais utilizados nesse grupo (PRAÇA *et al.*, 2004). Esta bactéria produz uma ou várias proteínas tóxicas à traça-das-crucíferas (MONNERAT *et al.*, 1999, 2007), tendo como grande vantagem de utilização sua especificidade, seu efeito não poluente ao meio ambiente, sua inocuidade aos mamíferos e

invertebrados e a ausência de toxicidade às plantas (GLARE e O'CALLAGHAN, 2000; BRODERICK *et al.*, 2006).

A utilização de *B. thuringiensis* (Bt) endofítico para o controle dessa praga depende da seleção de estirpes com elevada eficiência contra o inseto-alvo. O objetivo deste trabalho foi selecionar novas estirpes brasileiras de *B. thuringiensis* com alta toxicidade a *P. xylostella* e caracterizá-las quanto ao perfil protéico, gênico e cristalográfico para posteriores estudos no controle endofítico desta praga.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Estirpes e condições de crescimento

As três estirpes de *B. thuringiensis* S1905, S2122 e S2124 utilizadas neste trabalho são provenientes da Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa). Estas estirpes foram isoladas de amostras de solo de diferentes partes do Brasil e selecionadas por sua toxicidade a insetos da ordem Lepidoptera em testes preliminares realizados contra *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis*. A estirpe padrão para lepidópteros *B. thuringiensis subespécie kurstaki* (Btk) HD-1 S1450 foi obtida da Coleção de *Bacillus thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus* do Instituto Pasteur de Paris e foi incluída em todos os testes como controle positivo.

As estirpes foram crescidas em meio Embrapa (MONNERAT *et al.*, 2007), por 72 h, a 30 °C, sob agitação de 200 rpm, até sua completa esporulação e submetidas a bioensaios seletivos para avaliação da toxicidade.

Em seguida, esses mesmos cultivos foram centrifugados a 10.000 rpm por 30 minutos a 4 °C (BR4i centrífuga Jouan), congelados por no mínimo 16 horas durante à noite,

liofilizados por 18 horas em liofilizador Labconco modelo Lyphlock 18 e armazenadas em geladeira entre 4 a 10 °C.

## **2.2. Bioensaios**

As estirpes foram testadas contra lagartas de *P. xylostella*. Inicialmente foram realizados bioensaios seletivos com o caldo fermentado para avaliar a toxicidade a *P. xylostella*, ou seja, verificar se as estirpes eram capazes de causar uma mortalidade superior a 90% nas lagartas testadas. Em seguida, as estirpes foram submetidas a bioensaios de concentração resposta com a cultura bacteriana liofilizada para determinação da concentração letal necessária para matar 50% da população testada (CL<sub>50</sub>).

**A - Procedência dos insetos:** Para início da criação de *Plutella xylostella* no laboratório da Plataforma de criação de insetos da Embrapa, lagartas e pupas foram coletadas em plantio de repolho no Núcleo Rural do Taquara, Distrito Federal. As pupas foram colocadas em gaiolas de acrílico e depois da emergência dos adultos, estes foram alimentados em algodão molhado com solução de mel a 10%. Os caules de folhas de couve previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio 0,5% eram mantidos em garrafas de água dentro das gaiolas para que os adultos realizassem postura. Depois de três dias, as folhas com as posturas eram transferidas para vasilhas plásticas retangulares para eclosão. Depois da eclosão, as lagartas eram transferidas para as folhas novas a cada três dias. Após, a empupação, as pupas coletadas eram colocadas nas gaiolas de adultos para recomeçar o ciclo. Os insetos eram mantidos a temperatura de  $26 \pm 2$  °C,  $60 \pm 10\%$  de umidade relativa e fotoperíodo de 12 horas (MEDEIROS *et al.*, 2003).

**B – Bioensaio seletivo:** os bioensaios foram realizados, utilizando-se retângulos (aproximadamente 3 x 6 cm) de folhas de couve (*B. oleracea* var. *acephala*) previamente lavadas com esponja em água corrente e desinfetados em solução de hipoclorito a 0,5% por 20 minutos e enxaguados em água destilada. Na sequência, as folhas foram imersas por 10 minutos em suspensão contendo 90 mL de água destilada, 10 mL do caldo fermentado e espalhante adesivo Extravon (30 mL/1litro). O extravon deve ser utilizado em função da cerosidade das folhas. As folhas foram penduradas com auxílio de cliques para secar verticalmente em caixas de papelão com barbante como suporte (tipo varal). Após secagem completa das folhas, colocou-se uma folha em cada placa de Petri estéril descartável (90 x 15 mm) previamente identificada forrada com papel filtro. Dez lagartas de terceiro instar de *P. xylostella* foram colocadas em cada placa contendo folha tratada e foram feitas três repetições para cada tratamento. Três placas foram utilizadas como controle negativo sem a adição do bacilo e a estirpe *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1) S1450 foi utilizada como padrão. Foram realizados ao todo cinco tratamentos e três repetições em delineamento inteiramente casualizado. As placas foram fechadas com filme de PVC transparente e colocadas na sala de bioensaios, regulada sob as mesmas condições de temperatura e umidade da sala de criação do inseto. A primeira avaliação da mortalidade foi feita 48 horas após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas vivas foram transferidas para folhas novas livre do bacilo. Ao quinto dia (96 horas) foi feita a segunda e última leitura, avaliando-se a mortalidade total das lagartas mortas após 96 horas (MONNERAT *et al.*, 1999). As porcentagens médias de mortalidade de cada estirpe foram comparadas por análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) com o auxílio do programa estatístico Sigma Stat (KUO *et al.* 1992).

**C – Bioensaio de concentração-resposta:** Para realização do bioensaio, as três estirpes bacterianas e o padrão foram liofilizados, conforme descrito no item 2.1. Um grama de cada

liofilizado foi ressuspensionado em 10 mL de água destilada estéril. Após completa homogeneização em agitador tipo “vortex”, obteve-se uma suspensão-estoque na concentração de 0,1 g/mL. A partir desta suspensão, foram realizadas diluições seriadas. Um mL de cada uma das diluições foi transferido para copos com 99 mL de água destilada e espalhante adesivo Extravon (30 mL/litro). Em seguida, os bioensaios de diluições foram conduzidos conforme item 2.2. B, utilizando-se nove concentrações de esporos e cristais entre 0,01 e 100.000 ng/mL. Todos os bioensaios foram realizados em triplicata e em tempos diferentes e como padrão foi utilizado *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 e o delineamento foi inteiramente ao acaso. Os dados de mortalidade foram analisados através da análise de Probit e a concentração letal (CL<sub>50</sub>) foi determinada (ROBERTSON *et al.*, 2002). Os valores de CL<sub>50</sub> foram avaliados por análise de variância com auxílio do programa estatístico Sigma Stat (KUO *et al.* 1992).

### **2.3 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS–PAGE 10%)**

As quatro estirpes bacterianas tóxicas a *P. xylostella* foram cultivadas em meio Embrapa por 72 horas em incubador rotativo a 28 °C e 200 rpm e, em seguida, as proteínas foram extraídas de acordo com Lecadet *et al.* (1991). As culturas bacterianas foram transferidas na quantidade de 1,5 mL para tubos Eppendorf de dois mL, previamente autoclavado, e centrifugadas a 12.800 x g, em microcentrífuga Eppendorf, por 20 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos lavados com 1,5 mL de NaCl 0,5 M por 20 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e as paredes dos tubos eppendorf foram secas com papel filtro. Os sedimentos foram lavados por duas vezes com 1,5 mL de PMSF a 1mM e centrifugados a 12.800 x g por 20 minutos. Os sedimentos foram ressuspensionados em 500µL de PMSF 1 mM e armazenados a –20°C.

As preparações de esporos-cristais das estirpes foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS a 10% (SDS-PAGE), conforme procedimento descrito por Laemmli (1970). Alíquotas de 20 µL das preparações de esporos-cristais foram diluídas em tampão de amostra de proteína 5X (1,5M Tris-HCl, pH 6,8, Glicerol, SDS, 2β-Mercaptoetanol, Azul de bromofenol) fervidas a 100°C por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10%. Usaram-se 10 µL de marcador de proteína de alto e baixo peso molecular (Bench Mark™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen). A eletroforese foi realizada em aparelho Hoefer miniVE vertical electroforesis system – Amersham Pharmacia, contendo tampão de corrida 1X (Tris-base, glicina, SDS 10%), a voltagem constante de 120 V, por 3 horas e 30 minutos. O gel foi corado em solução corante de Comassie blue (40% metanol e 25% de Comassie blue 250-R) por uma hora e descorado em solução de metanol 40% e ácido acético 10%) por 1-2 horas até visualização dos perfis protéicos das estirpes. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1) foi utilizado como padrão.

#### **2.4 Preparações das amostras de DNA e Reação em cadeia da Polimerase (PCR)**

As quatro estirpes foram caracterizadas por PCR. Este método foi usado para a identificação dos genes *cry* presentes no DNA total das estirpes tóxicas a *P. xylostella*. Todas as reações ocorreram em tubos de polipropileno de 0,2 mL, em um termociclador MJ Research, Inc. (PTC-100™).

O DNA total dos isolados foi extraído segundo a metodologia descrita por Bravo *et al.* (1998). As estirpes foram cultivadas em meio Ágar Embrapa (MONNERAT *et al.*, 2007) a 30°C por 16 horas. Uma alçada de células foi transferida para 100 µl de água destilada, homogeneizada em vortex, congelada a – 20 °C e, em seguida, fervida por 10 minutos para lisar as células. Depois, o material foi centrifugado a 12.800 x g por 30 segundos, em



microcentrífuga Eppendorf. O sobrenadante sem o pellet foi transferido cuidadosamente para outro tubo Eppendorf e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi então preparada. Para a realização das PCRs, 15 µL do sobrenadante da cultura foram transferidos para um tubo contendo 0,5 µM de cada iniciador, 0,2 µM de dNTP mix, tampão de Taq 1x e 2,5 U de Taq DNA polimerase (5.0 U) em um volume total de 50 µL.

Foram usados iniciadores gerais para identificação dos genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry5*, *cry8*, *cry11*, *cry12*, *cry14*, *cry17*, *cry19*, *cry21*, *cry24*, *cry27*, *cry32*, *cry39*, *cry40*, *cyt1* e *cyt2* e específicos para identificação dos genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry8*, *cry9*, *cry10*, *cry13*, *cry25*, *cry29* e *cry30* (Tabela 1).

Tabela 1 - Características dos iniciadores utilizados nas reações de PCR.

Oligos	Sequência	Genes	Bandas de DNA (pb)	Cristal protéico (kDa)	Tm (°C)
cry1 Ceron <i>et al.</i> , 1995	5'TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA3' (d) <sup>1</sup> 5'TATCGGTTTCTGGGAAGTA3' (r) <sup>2</sup>	<i>cry1Aa</i>	272	133	48
		<i>cry1Ab</i>	284	130	
		<i>cry1Ac</i>	272	133	
		<i>cry1B</i>	290	140	
		<i>cry1C</i> ,	284	132-134	
		<i>cry1D</i>			
		<i>cry1Ea</i>	275	133	
		<i>cry1Eb</i>	290	133	
cry1 Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA3' (d) 5'TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA 3' (r)	<i>cry1Aa</i>	246	133	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'CAGCCGATTTACCTTCTA 3' (d) 5'TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA3' (r)	<i>cry1Ad</i>	171	133	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'GTTAGATTAAATAGTAGTGG 3' (d) 5'TGTAGGTGGTACTGTTATTG 3' (r)	<i>cry1Ac</i>	180	133	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'AACAACCTATCTGTTCTTGAC3' (d) 5'CTCTTATTATACTTACACTAC3' (r)	<i>cry1Ab</i>	216	130	53

Oligos	Sequência	Genes	Bandas de DNA (pb)	Cristal protéico (kDa)	Tm (°C)
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'CTTCATCACGATGGAGTAA3' (d) 5'CATAATTTGGTCGTTCTGTT3' (r)	<i>cry1B</i>	367	140	53
cry1 esp. Ceron <i>et al.</i> , 1994	5'AAAGATCTGGAACACCTTT 3' (d) 5'CAAACCTCTAAATCCTTTCAC 3' (r)	<i>cry1C</i>	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>cry1I</i>	2100	72	54
cry2 Ben ravo <i>et al.</i> , 1998	5'GAGTTTAATCGACAAGTAGATAATTT3' (d) 5'GGAAAAGAGAATATAAAAATGGCCAG3' (r)	<i>cry2</i>	526	72	51
cry2Aa <i>et al.</i> , 1997	5'GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG3' (d) 5'GAGATTAGTCGCCCTATGAG 3' (r)	<i>cry2Aa</i>	498	72	53
cry2Ab Ben-Dov <i>et al.</i> , 1997	5'GTTATTCTtAATGCAGATGAATGGG3' (d) 5'TGGCGTTAACAATGGGGGGAGAAAT3' (r)	<i>cry2Ab</i>	546	72	54
cry2Ac Ben-Dov <i>et al.</i> , 1997	5'GTtAttCTTAATGCAGATGAATGGG3' (d) 5'GCGTTGCTAATAGTCCCAACAACA 3' (r)	<i>cry2Ac</i>	725	72	54
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

Oligos	Sequência	Genes	Bandas de DNA (pb)	Cristal protéico (kDa)	T <sub>m</sub> (°C)
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
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'CTTGTATAGGCCTTCCTCCG3' (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'CTCATAATTTCCGTCATAAAT 3' (r)	<i>cry19Aa</i> <i>cry19Ba</i> <i>cry39</i>	616 631 619	75	51

Oligos	Sequência	Genes	Bandas de DNA (pb)	Cristal protéico (kDa)	Tm (°C)
cry24+40 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5' TTATCAATGTTAAGGGATGC3' (d) 5' ACTGGATCTGTGTATATTTTCCTAG3' (r)	<i>cry24Aa</i> <i>cry40Aa</i>	304 366	76	48
cry29 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5' TCAGCTCCAATAACTGGTG 3' (d) 5' GCATGTCATCCCCCTTGTCTA3' (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' ATGTTTGCGACACCATTTTC 3' (r)	<i>cry32Aa</i> <i>cry32Ba</i> <i>cry32Ca</i> <i>cry32D</i>	677 676	82	54
cyt1 Bravo <i>et al.</i> , 1998	5' AACCTCAATCAACAGCAAGG 3' (d) 5' GGTACACAATACATAACGCCACC3' (r)	<i>cyt1Aa</i> <i>cyt1Ab</i>	522 525	27	51
cyt2 Ibarra <i>et al.</i> , 2003	5' ATTACAAATTGCAAATGGTATTCC 3' (d) 5' TTCAAACATCCACAGTAATTTCAAATGC 3' (r)	<i>cyt2Aa</i> <i>cyt2Ba</i> <i>cyt2Bb</i> <i>cyt2Ca</i>	355	29	50

Uma alíquota de 24 µL de cada produto de PCR foi misturada com tampão de amostra 6X e aplicada em gel de agarose 1%. A corrida eletroforética foi processada em Tampão TBE 1X (Tris-base, Ácido bórico, EDTA 0,5M – pH 8,0). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio diluído em água na concentração de 1µg/mL por 20 minutos, e descorado em água destilada por 15 minutos. O gel foi observado em transluminador sob luz UV e fotografado em foto-documentador modelo Eagle Eye (Stratagene). As estirpes *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk), *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Btt), *B. thuringiensis*

subsp. *israelensis* (Bti), *B. thuringiensis* subsp. *medellin* (Btmed) e *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan* (Btjeg) foram utilizadas como padrão.

## **2.5. Microscopia eletrônica**

As estirpes foram analisadas morfológicamente através de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

### **2.5.1 Microscopia eletrônica de varredura**

A estirpes foram cultivadas em meio Embrapa em incubador rotativo a 200 rpm, a 30 °C, por 48 a 72 horas (até completa esporulação). Para a purificação de cristais, foi utilizado o protocolo descrito por Thomas e Ellar (1983). Duzentos mL das estirpes selecionadas e do padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* foram transferidos para tubo Falcon previamente autoclavado e esterilizado e centrifugados a 12.800 x g, por 30 minutos, a 5 °C (Centrífuga BR4i – Jouan). Os sobrenadantes foram coletados para se observar a presença de cristais. Em caso positivo, estes eram armazenados. Os sedimentos foram lavados por três vezes em 10 mL de uma solução contendo PMSF 0,1 mM e triton 0,01% e ressuspensos em três mL de solução TTN (Triton 1%, Tris HCl 0,05M pH 8 e NaCl 0,01M). Em seguida, as suspensões foram sonicadas a três pulsos de 1 minuto, com intervalos de 1 minuto entre cada pulso, para separar os esporos dos cristais e durante esta etapa, as amostras foram mantidas no gelo.

Os gradientes de sacarose foram preparados em tubos de 30 mL (buckets), nas seguintes concentrações: 84%, 79%, 72% e 69%, e sobre os mesmos foram acrescentadas às suspensões de esporos-cristais. Os gradientes foram então centrifugados a 23.000 rpm por 50 minutos a 14 °C (Centrífuga de Alta Performance Beckman Coulter, modelo Avanti MM J-301). Após a

centrifugação, as bandas contendo os cristais foram recuperadas, colocadas em novos tubos, e a elas foram adicionados igual volume de água. Essas amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por dez minutos, a 4 °C (Centrífuga BR4i, Jouan). Os sobrenadantes foram descartados, os sedimentos foram ressuspensos em um mL de solução triton 0,01% e observados no microscópio de contraste de fases para confirmação da presença de cristais e lavados novamente por duas vezes com a mesma solução de triton. Os sedimentos finais foram ressuspensos em 500 µL de solução de PMSF 0,1 mM. As amostras foram analisadas em gel de proteínas para controle da pureza das mesmas e depois armazenadas a – 20 °C.

As suspensões de cristais das estirpes foram liofilizadas em Liofilizador Christ, modelo Alpha 2-4 LD plus. Depois de liofilizadas, as amostras foram depositadas sobre suportes metálicos, cobertas com ouro por 180 segundos com o auxílio do metalizador Emitech Modelo K550 e observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962.

### **2.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão**

Para observação de esporos e cristais de *B. thuringiensis*, as culturas bacterianas crescidas conforme item 2.1 foram centrifugadas a 8000 rpm por dois minutos (Centrífuga Mikro 200 – Hettich), fixadas em 2,5% glutaraldeído e em tampão cacodilato de sódio a 0.1 M, pH 7.0 por 4 horas e mantidos em agitação “over night”. Os esporos-cristais fixados foram lavados por três vezes em tampão cacodilato por 10 minutos e duas vezes em água. Em seguida, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2% e em tampão cacodilato a 0.2 M por 1 hora no escuro. Depois de lavados três vezes em tampão cacodilato e duas vezes em água por 10 minutos, os esporos-cristais bacterianos foram desidratados em série etanólica (10 a 100%) por 20 minutos para cada série e em etanol puro para a completa desidratação. Os esporos-

cristais foram embebidos em resina Epon a 4 °C sob agitação e incubados a 70 °C. Cortes ultrafinos (60 µm) foram colocados em acetato de uranila a 2% no escuro por 1 hora. Em seguida, os cortes foram lavados em água e observados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão modelo JEOL1011C. Durante as etapas de preparação das amostras, elas foram centrifugadas a 8000 rpm por poucos segundos para formação dos concentrados ou “pellets”.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estirpes de *B. thuringiensis* S1905 e S2122 causaram 100% de mortalidade a lagartas de 3<sup>o</sup>. instar de *P. xylostella* na avaliação realizada 48 h após exposição das lagartas a bioensaios seletivos (Kruskal-Wallis:  $H_3 = 10,8$ ,  $P = 0,013$ ), enquanto S2124 causou 58,33% de mortalidade após mesmo período e 98,33% de mortalidade após 96 horas (Kruskal-Wallis:  $H_3 = 3,0$ ,  $P = 0,392$ ). A mortalidade na testemunha foi de 10% em todos os bioensaios (Tabela 2).

Tabela 2 – Mortalidade de lagartas de 3<sup>o</sup> instar de *Plutella xylostella* tratadas com estirpes brasileiras de *Bacillus thuringiensis* (media ± desvio padrão)

Estirpes de <i>B.thuringiensis</i>	% de Mortalidade	
	48 horas	96 horas
S1905	100 ± 0a	100 ± 0a
S2122	100 ± 0a	100 ± 0a
S2124	58,33 ± 2,877b	98,33 ± 2,877 <sup>a</sup>
S1450 <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1	100 ± 0a	100 ± 0a

Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem entre si

Os resultados de bioensaios após 48 horas apresentaram diferenças significativas entre as estirpes. As estirpes S1905 e S2122 foram semelhantes entre si e ao padrão e foram mais efetivas em um tempo mais curto contra *P. xylostella* do que a estirpe S2124. No entanto, a toxicidade destas estirpes quando avaliadas e comparadas com a estirpe padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, 96 horas após o início dos testes, não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Os resultados foram similares aos de outros estudos desenvolvidos com outras estirpes de *B. thuringiensis* que mostraram alta atividade a *P. xylostella* (MEDEIROS *et al.*, 2005; MONNERAT *et al.*, 2007; VIANA *et al.*, 2009).

As lagartas mortas em bioensaios seletivos apresentaram corpos flácidos, e tegumentos de cor marrom à marrom-escura sem brilho. Nos bioensaios com a estirpe S2124, as lagartas que sobreviveram as primeiras 48 horas de bioensaio, apresentaram-se lentas e com dificuldade de se movimentar. Estes sintomas são característicos de lagartas infectadas por *B. thuringiensis* e já foram observados por muitos grupos de pesquisa em outros estudos com *B. thuringiensis* (HABIB e ANDRADE, 1998; VIANA *et al.*, 2009).

A CL<sub>50</sub> das três estirpes testadas variou de 2,326 a 4,481 ng/mL (Tabela 3). As estirpes apresentaram valores de CL<sub>50</sub> semelhantes ao padrão Btk HD-1 (ANOVA: F = 0,348; P = 0,595). Porém, é importante observar o resultado do bioensaio seletivo com 48 horas (tabela 1), pois mostrou a capacidade das estirpes S1905 e S2122 de agir mais rapidamente no controle de *P. xylostella* que a estirpe S2124. Essa característica é de grande importância para o desenvolvimento de um produto biológico de ação rápida para o controle de insetos-praga. Os resultados de semelhança de estirpes de *B. thuringiensis* com o padrão HD-1 em bioensaios seletivos para controle de insetos da ordem Lepidoptera já haviam sido relatados por De Souza *et al.* (1999), Praça *et al.* (2004) e Monnerat *et al.* (2007).



Tabela 3 – Concentração letal (CL<sub>50</sub>) das estirpes de *B. thuringiensis* para matar de lagartas de terceiro instar de *P. xylostella* cinco dias após tratamento (96 horas)

Estirpes	CL <sub>50</sub> (ng/mL)	Intervalo de confiança (95%)
S1905	3.430±1.513a	1.381 – 5.574
S2122	2.326±1.732a	0.421 – 24.176
S2124	4.842±3.261a	1.932 – 13.4987
S1450 Btk HD-1	4.202±0.558a	0.556 – 5.600

Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem entre si pelo intervalo de confiança de acordo com a análise de Probit.

Por meio da análise da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE-10%) da mistura de esporos e cristais das estirpes S1905 e S2124 verificou-se que as preparações são compostas de dois polipeptídios principais de aproximadamente de 130 e 65 kDa (Figura 1), semelhantes entre si e ao perfil do padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (HOFTE e WHITELEY, 1989; LERECLUS *et al.*, 1993). Já a estirpe S2122 apresentou apenas a proteína de 130 kDa. Os perfis protéicos de 130 e 65 kDa correspondem as proteínas Cry1 e Cry2 presentes normalmente nas estirpes ativas contra lepidópteros e dípteros (SCHENPF *et al.*, 1998, PRAÇA *et al.*, 2004), corroborando com os resultados obtidos nos bioensaios com as três estirpes que apresentaram atividade contra *P. xylostella*.

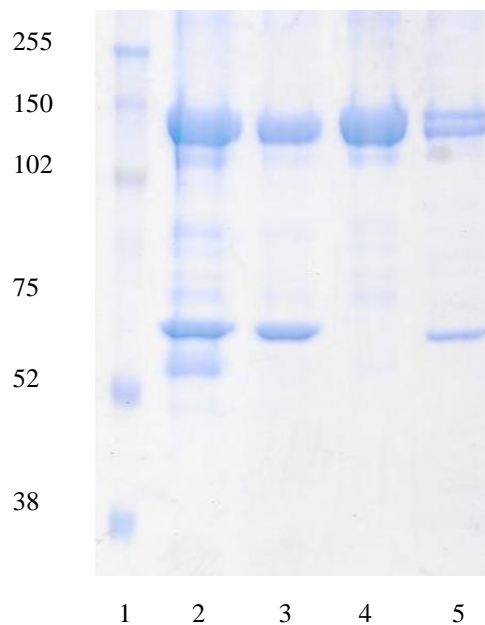


Figura 1 – SDS-PAGE 10% do complexo esporo-cristal das estirpes de *B. thuringiensis* S1905, S2122 e S2124. 1: Marcador Invitrogen Bench Marker<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder; 2: HD-1; 3: S1905, 4: S2122 e 5: S2124

Por meio de PCR, usando DNA total das estirpes S1905, S2122 e S2124 e iniciadores gerais e específicos, foram obtidos amplicons de tamanhos esperados para a detecção de genes das classes *cry1* e *cry2*, compatíveis com as estirpes efetivas contra insetos da Ordem Lepidoptera (Tabela 4).

Tabela 4 – Perfil protéico, genes *cry* e tipos de cristais presentes nas estirpes S1450 HD-1, S1905, S2122 e S2124 de *B. thuringiensis*

Estirpes	Perfil protéico (kDa)	Genes <i>cry</i>	Tipos de cristais
S1905	130 – 65	<i>cryIAa, cryIAb, cryIAc, cryIB, cry2Aa e cry2Ab</i>	bipiramidal, esférico e cubóide
S2193	130	<i>cryIAa, cryIAb, cryIAd, cryIC e cryID, cryIF e cry2Ab</i>	bipiramidal, esférico e cubóide
S2195	130 – 65	<i>cryIAa, cryIE, cry2Aa e cry2Ab</i>	bipiramidal, esférico e cuboide
Btk HD-1 S1450	130 – 65	<i>cryIAa, cryIAb, cryIAc, cryIB e cry2Aa e cry2Ab</i>	bipiramidal, esférico e cubóide

A estirpe S1905 apresentou perfil gênico semelhante ao da estirpe padrão Btk HD-1 (*cryIAa, cryIAb, cryIAc, cryIB, cry2Aa e cry2Ab*) (Figura 2). Estes resultados foram semelhantes aos resultados apresentados por Praça *et al.* (2004) para as estirpes S234 e S997 tóxicas a insetos lepidópteros.

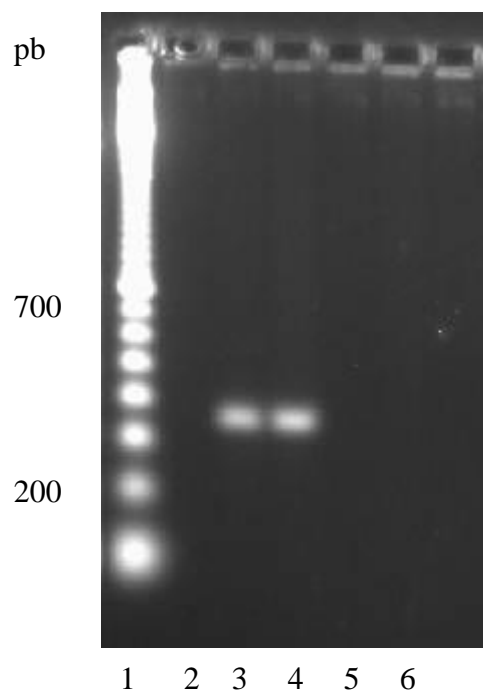


Figura 2 - Produtos de PCR obtidos com oligonucleotídeos específicos para genes tipo *cryIB*, através da utilização dos iniciadores CJ9 e DNA das estirpes S1450 HD-1, S1905, S2122 e S2224. 1- Marcador de massa molecular, 100bp DNA Ladder (Pharmacia), 2- Controle negativo, 3 - HD-1, 4 – S1905, 5- S2122 e 6 – S2124

Já a estirpe S2122 apresentou sete genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAd*, *cryIC*, *cryID*, *cryIF* e *cry2Ab*. Três genes foram semelhantes ao *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*cryIAa*, *cryIAb* e *cry2Ab*) e três genes (*cryIAb*, *cryIC* e *cryID*) ao *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* (Bta) (PRAÇA *et al.*, 2004; MEDEIROS *et al.*, 2005). As duas subespécies citadas são princípios ativos de bioinseticidas já registrados comercialmente e efetivos para o controle de *P. xylostella*. Os genes *cryIC* e *cryID* presentes na estirpe S2122 são conhecidos como codificadores de proteínas tóxicas a *S. frugiperda* e *S. exigua* (BRAVO *et al.*, 1998), insetos-pragas também da Ordem Lepidoptera. No entanto, outros trabalhos relatam baixa toxicidade destas proteínas a *S. frugiperda*, o que pode sugerir a existência de diferenças de susceptibilidade entre populações de *S. frugiperda* a algumas toxinas de Bt, provavelmente

em função da variabilidade genética existente entre as populações testadas (MONNERAT *et al.* 2006).

Do total dos genes encontrados na estirpe S2122, quatro deles (*cry1Ad*, *cry1C*, *cry1D* e *cry1F*) não estão presentes nas estirpes utilizadas como princípio ativo dos produtos comerciais e demonstram a grande riqueza gênica desta estirpe brasileira de *B. thuringiensis*. Este fato é de grande importância para o futuro da agricultura mundial, pois representa uma ótima perspectiva para a produção de novos bioinseticidas com novas toxinas que poderão ser utilizados no manejo de lepidópteros-pragas a campo.

A presença de um grande número de genes no perfil das estirpes bacterianas pode ser uma ótima alternativa no manejo da resistência dos insetos-praga a *B. thuringiensis*, uma vez que quanto maior o número de toxinas, mais difícil dos insetos desenvolverem mecanismos de resistência a *B. thuringiensis*.

A estirpe S2124 apresentou os genes *cry1Ab*, *cry1E*, *cry2Aa* e *cry2Ab* (Tabela 3). É importante ressaltar que a presença dos genes *cry1E* e *cry1F* em estirpes de *B. thuringiensis* de acordo com Bravo *et al.* (1998) é menos abundante na natureza e alguns grupos de pesquisa relataram que estes genes são mais comuns nas regiões dos trópicos úmidos. A proteína Cry1E apresenta eficiência distinta no controle de espécies do gênero *Spodoptera* (LOGUERCIO *et al.*, 2001). Já os genes pertencentes ao grupo *cry1A* estão entre os mais frequentes, o que pode ser observado no perfil gênico das estirpes alvo desse estudo e nos trabalhos relacionados a algumas coleções no mundo (BRAVO *et al.*, 1998).

Todas as estirpes apresentaram genes *cry2A*. Cardenas *et al.* (2001) mencionaram que a presença desses genes em algumas estirpes é importante, porque esse gene codifica algumas toxinas ativas a insetos da ordem Lepidoptera e Diptera. Bourgouin *et al.* (1988) demonstraram que algumas estirpes de *B. thuringiensis* possuem apenas um gene, enquanto outras podem ter múltiplos genes, conforme relatado acima.

Os genes mais comumente encontrados neste estudo foram os genes *cry1Ab* e *cry2Ab*. A presença dos genes *cry1* e *cry2* nas estirpes S1905 e S2124 foram consistentes com a produção das proteínas de 130 e 65 kDa (Figura 1), respectivamente. Mas a estirpe S2122 não apresentou a proteína de 65 kDa. Provavelmente, o gene para codificação da proteína Cry2 pode estar silenciado, portanto será importante estudar as características desta estirpe com mais detalhes no futuro.

Todas as estirpes mencionadas neste estudo apresentaram a proteína Cry1Ab. Alguns pesquisadores mostraram a toxicidade das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac contra *P. xylostella* (MONNERAT *et al.*, 1999; CARDENAS *et al.*, 2001; XIE *et al.*, 2010). Cry1Ab é conhecida como a proteína mais tóxica a *P. xylostella* (MONNERAT *et al.*, 1999). A toxicidade das estirpes se deve provavelmente ao efeito das toxinas conjuntas, uma vez que muitos trabalhos relatam a alta toxicidade das proteínas Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1B a *P. xylostella* (BRADLEY *et al.*, 1995; MONNERAT *et al.*, 1999).

Análises ultraestruturais de esporos e cristais de *B. thuringiensis* por microscopia eletrônica de varredura e transmissão mostraram a presença de três diferentes tipos de cristais nas estirpes S1905, S2122 e S2124. As estirpes produziram cristais bipiramidais, esféricos e cubóides (Figuras 3 e 4). Estas formas vistas através de exames microscópicos podem fornecer indicações sobre a atividade inseticida dos cristais de uma estirpe (TAILOR *et al.*, 1992; LERECLUS *et al.*, 1993; HABIB e ANDRADE, 1998). A morfologia desses cristais é semelhante ao *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 como descrito previamente em outros estudos com estirpes de *B. thuringiensis* (PRAÇA *et al.*, 2004; MONNERAT *et al.*, 2007). A presença de cristais nas estirpes de *B. thuringiensis* é a principal característica que distingue esta espécie de *Bacillus* das outras (SEZEN *et al.*, 2010).

Cristais bipiramidais podem estar associados às proteínas do tipo Cry1, que apresentam atividade contra insetos da ordem Lepidoptera e Coleoptera e os cristais cubóides

podem estar associados com as proteínas do tipo Cry2 que apresentam atividade contra insetos da ordem Lepidoptera e Diptera (DANKOCSIK *et al.*, 1990; BRAVO *et al.*, 1998; PRAÇA *et al.*, 2004; MONNERAT *et al.*, 2007). A estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 utilizada como padrão apresentou os mesmos cristais que as três estirpes, confirmando o observado por Höfte *et al.* (1988). Os cristais cubóides estavam presentes nas três estirpes estudadas, embora este cristal seja conhecido como tóxico a insetos coleópteros (Figura 3), mas provavelmente apresentem baixa toxicidade a coleópteros como o observado por Praça *et al.* (2004) em testes contra *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), quando estirpes semelhantes ao Btk foram testadas e mostraram a necessidade de altas concentrações destas estirpes para o controle desta espécie.

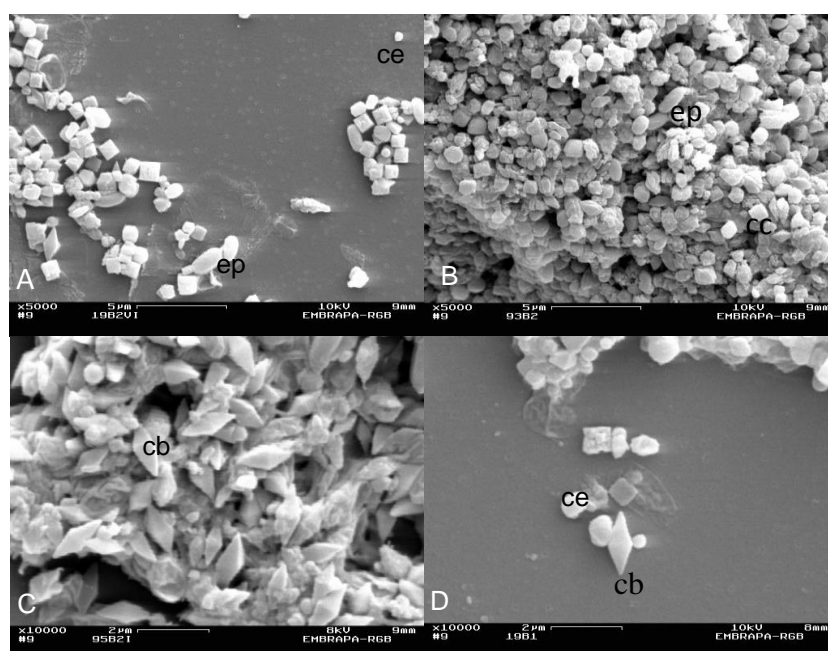


Figura 3 - Micrografia de varredura da mistura espora-cristal de *B. thuringiensis* A - S1905, B - S2122, C - S2124 e D - S1450 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, ce - cristal esférico; cb – cristal bipiramidal, ep – espora e cc - cristal cubóide

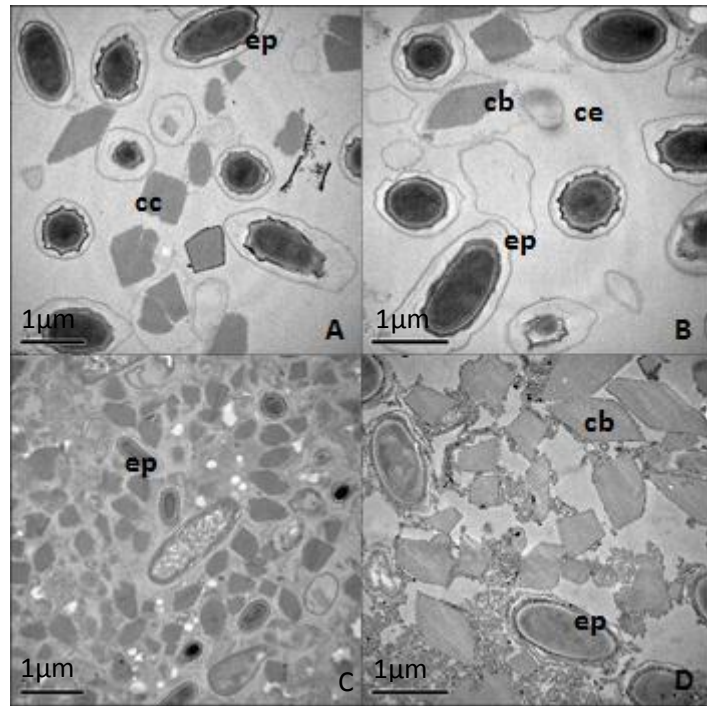


Figura 4 - Micrografia de transmissão da mistura esporos-cristais de *B. thuringiensis* A - S1450 (25000x), B - S1905 (30000x), C - S2122 (12000x) e D - S2124 (30000x), cb – cristal bipiramidal; ep - esporo; ce – cristal esférico e cc – cristal cubóide

A presença das proteínas Cry1 esta associada à atividade a insetos da ordem Lepidoptera, conforme demonstrado por Monnerat *et al.* (2007) e Dos Santos *et al.* (2009) para *P. xylostella* e espécies do gênero *Spodoptera*, respectivamente.

A variabilidade genética entre as estirpes é de grande importância na produção de novos bioinseticidas para serem utilizados no manejo integrado de *P. xylostella* e de outros lepidópteros-pragas. A alta toxicidade das estirpes pode estar ocorrendo devido à ação sinérgica das toxinas existentes nas estirpes, conforme demonstrado por Monnerat *et al.* (1999) em estudos com estirpes de Bt e as suas toxinas puras, onde a proteína Cry1Ab apresentou valores de CL<sub>50</sub> semelhantes a estirpe HD-133. Com relação à estirpe S1905, a característica que pode estar influenciando na atividade inseticida da estirpe é a presença das



proteínas Cry1Ab e Cry1B, pois de acordo com Bradley *et al.* (1995), a proteína Cry1B é ativa contra *P. xylostella* e pode aumentar a toxicidade da estirpe ou da proteína Cry1Ab. Provavelmente, no caso da toxicidade da estirpe S2122 a *P. xylostella*, as proteínas Cry1Ab e Cry1C são provavelmente as responsáveis pela toxicidade ou pelo efeito sinérgico de todas as toxinas presentes nesta estirpe.

Bioensaios futuros com a proteína Cry1B misturada com outras proteínas e principalmente com a Cry1Ab deverão ser realizados para avaliar a atividade inseticida destas proteínas conjuntas contra *P. xylostella*. Portanto, torna-se necessário realizar bioensaios com proteínas individuais e em conjunto para confirmar a toxina ou toxinas responsáveis pela mortalidade (SCHNEPF *et al.*, 1998) contra *P. xylostella*. A realização destes ensaios será importante para avaliar o efeito sinérgico das toxinas, ou mesmo, a interação destas com os esporos.

Todas as estirpes deverão ser cuidadosamente analisadas antes da escolha de uma destas estirpes para o desenvolvimento de um novo bioinseticida. As estirpes S2122 e S2124 são de interesse para a agricultura por apresentarem toxinas diferentes das toxinas dos bioinseticidas comerciais existentes no mercado brasileiro. Todas as estirpes poderão ter uma ótima aplicação no campo, através da produção de bioinseticidas com preços mais acessíveis e compatíveis com a agricultura nacional.

O desenvolvimento de bioinseticidas é de grande importância para auxiliar na manutenção da sustentabilidade dos sistemas de produção, conferindo níveis adequados e consistentes de controle, além de poder ser utilizado na agricultura orgânica. É ainda, um processo importante para atender a demanda dos consumidores por produtos e alimentos mais saudáveis e livres de resíduos.

Produtos com diferentes estirpes de *B. thuringiensis* poderão ser utilizados no manejo da resistência de lagartas de *P. xylostella* a *B. thuringiensis*, o que já vem sendo realizado em

Cuba (FERNANDES-LARREA, 1999), como também poderá ser utilizado no controle endofítico desta praga e de algumas outras pragas agrícolas de difícil controle por produtos cuja ação ocorre por contato. Mesmo com o desenvolvimento de novos produtos, é necessária a combinação de estratégias de controle como monitoramento da praga, uso de inimigos naturais, rotação entre produtos biológicos e químicos, rotação de culturas, entre outras.

Os genes das estirpes de *B. thuringiensis* alvo desse estudo poderão também ser utilizadas para a construção de plantas geneticamente modificadas para o controle de outros lepidópteros-praga.

#### 4 CONCLUSÕES

Este trabalho possibilitou a identificação de três estirpes brasileiras com alta toxicidade a *P. xylostella*. As estirpes causaram 100% de mortalidade em bioensaios seletivos e os valores de  $CL_{50}$  variaram entre 2,33 a 4,84 ng/mL, apresentando resultados de toxicidade semelhantes ao padrão.

A análise molecular por PCR mostrou que as estirpes S1905, S2122 e S2124 apresentaram os mesmos fragmentos de DNA para os genes *cryIAa* e *cry2Ab*, além de outros genes com o *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB* e *cry2Aa* para a estirpe S1905, *cryIAb*, *cryIAd*, *cryIC* e *cryID*, *cryIF* para a estirpe S2122 e *cryIE* e *cry2Ab* para a estirpe SS2124, demonstrando a alta variabilidade de genes presentes nestas estirpes. As estirpes S1905 e S2124 apresentaram duas proteínas principais de 130 e 65 kDa, e a S2122 apresentou apenas a proteína de 130 kDa conhecidas como toxinas efetivas contra *P. xylostella*.

Bioensaios futuros com as proteínas puras ainda não estudadas como Cry1B, Cry1D, Cry1E e Cry1F misturada com outras proteínas e principalmente com a Cry1Ab deverão ser realizados para avaliar a atividade inseticida destas proteínas conjuntas contra *P. xylostella*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAEKA, J. H.; KIM, DAE-WON, L.; CHUNG, B. K.; TADASHI, M.; LEE, S. H. Identification and characterization of ace1-type acetylcholinesterase likely associated with organophosphate resistance in *Plutella xylostella*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 81, p. 164-175, 2005.
- BEN-DOV, E.; ZARITSKY, A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAL, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TROITSKAYA, E.; DUBITSKY, A.; BEREZINA, N.; MARGALITH, Y. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field collected strains of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Birmingham, v. 63, n. 12, p. 4883-4890, 1997.
- BOURGOUIN, C.; DELÉCLUSE, A.; RIBIER, J.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* gene encoding a 125-kilodalton larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 3575-3583, 1988.
- BRADLEY, D.; HARKEY, M. A.; KIM, M.-K.; BREVER, D.; BAUER, L. S. The insecticidal CryIB protein of *Bacillus thuringiensis* spp. *Thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 65, p. 162-173, 1995.
- 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**, Birmingham, v. 64, p. 4965-4972, 1998.

BRODERICK, N.A.; RAFFA, K. F.;, HANDELSMAN, J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. **Proceedings of the National Academy of Science**, USA, v. 103, n. 41, 15196-15199, 2006.

CÁRDENAS, M.I.; GALÁN-WONG, L.; FERRÉ-MANZANERO, J.; PEREYRA-ALFÉREZ, B. Selección de toxinas cry contra *Trichoplusia ni*. **Ciencia Uanl**, 4: 51-62, 2001.

CASTELO BRANCO M.; FRANÇA, F. H.; PONTES, L. A.; AMARAL, P. S. Avaliação da suscetibilidade a inseticidas de populações da traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 553-556, 2003.

CASTELO BRANCO, M; VILLAS BOAS, G. L.; FRANÇA, F. H. Nível de dano da traça-das-crucíferas em repolho. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 154-157, 1996.

CERON, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; BRAVO, A. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Birmingham, v. 60, p. 353-356. 1994.

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.

DANKOCSIK, C.; DONOVAN, W.P.; IANY, C.S. 1990. Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 2087-2094.

DE-SOUZA, M.T.; LIMA, M.I.; SILVA-WERNECK, J.O.; DIAS, J.C.S.; RIBEIRO, B.M. Ultrastructural and molecular characterization of the parasporal crystal proteins of *Bacillus*

*thuringiensis* subsp. *kurstaki* S93 active against *Spodoptera frugiperda*. **Biocell**, v. 23, n. 1, p. 43-49, 1999.

DOS SANTOS, K.B., NEVES, P., MENEGUIM, A.M., DOS SANTOS, R.B., DOS SANTOS, W.J., BOAS, G.V., DUMAS, V., MARTINS, E., PRAÇA, L.B., QUEIROZ, P., BERRY, C., MONNERAT, R. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v. 50, p. 157-163, 2009.

FERNÁNDEZ-LARREA, O. A review of *Bacillus thuringiensis* (Bt) production and use in Cuba. 1999. *Biochemistry news and information*, v. 20, n. 1, p.47-48, 1999.

FRANÇA, F.H.; MEDEIROS, M.A. Impacto de combinação de inseticidas sobre a produção de repolho e parasitóides associados com a traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.16, n.2, p.132-135, 1999.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety***. New York; John Wiley and Sons, 350. ISBN 0-471-49630-8, 2000.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: **Controle microbiano de insetos**. Ed. Alves, S.B., FEALQ, Piracicaba, p. 383-446, 1998.

HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Review**, v. 53, v. 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**. Birmingham, v. 69, p. 5269-5274, 2003.

IMENES, S. D. L.; CAMPOS, T. B.; RODRIGUES NETTO S. M.; BERGMANN, E. C. Avaliação da atratividade de feromônio sexual sintético da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), em cultivo orgânico de repolho. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 81-84, 2002.

KUO, J., FOX, E., MACDONALD, S. **Sigmastat: statistical software for working scientists**. Users manual. Jandel ScientiWc, San Francisco, CA. 1992.

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

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

LERECLUS, D.; BOURGOUIN, C.; LECAD ET, M.M.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal d-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: Issar Smith, R.; Slepecky, A.; Setlow, P. (Eds). **Regulation of prokaryotic development**. Washington: American Society for Microbiology. 1989. p. 71-88.

LOGUERCIO, L. L.; SANTOS, C. G.; BARRETO, M. R.; GUIMARAES, C. T.; PAIVA, E. Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a *cry* constitution with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 362-367, 2001.

MEDEIROS, P. T.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G.; SOUZA, N. R. **Instalação e manutenção de criação massal da traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*)**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 4p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular técnica, 29).

MEDEIROS, P. T.; FERREIRA, M. N.; MARTINS, E. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. **Pesquisa Agropecuária Brasília**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1145-1148, 2005.

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; QUEIROZ, P.; ORDÚZ, S.; JARAMILLO, G.; BENINTENDE, G.; COZZI, J.; REAL, M.D.; MARTINEZ-RAMIREZ, C. R.; CERÓN, J.; IBARRA, J. E.; RINCON-CASTRO, M. C. D.; ESPINOZA, A. M.; MEZA-BASSO, L.; CABRERA, L.; SÁNCHEZ, J.; SOBERON, M.; BRAVO, A. Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Birmingham, v. 72, n. 11, p. 7029-7035. 2006.

MONNERAT, R.G., BATISTA, A. C., MEDEIROS, P. T., MARTINS, E., MELATTI, I V., PRAÇA, L., DUMAS, V., DEMO, C., GOMES, A. C., FALCÃO, R.; BERRY, C. (2007). Characterization of Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, v. 41, p. 291–295, 2007.

MONNERAT, R.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R.; PUSZTAI-CAREY, M.; BORDAT, D.; FRUTOS, R. Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in Diamond moth, *Plutella xylostella*. **Current Microbiology**, v.39, p.159-162, 1999.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. DE S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 11-16. 2004.

PRACA, L. B.; RAMOS, F. R.; RAMOS, F. R.; WAGNER, F. O.; SOARES, C. M. S.; SUJII, E.; MONNERAT, R.G. Suscetibilidade da traça-das-crucíferas a *Bacillus thuringiensis* em repolho no Distrito Federal. **Universitas**. Ciências da Saúde (UNICEUB. Impresso), v. 8, p. 17-31, 2010.

ROBERTSON, J. R.; PREISLER, H. K.; RUSSELL, R. M. **Polo Plus. Probit and logit analysis user's guide**. LeOra Software, Petaluna, CA. 2002.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 62, p. 775-806. 1998.

SEZEN, K.; KATI, H.; MURATOGLU, H.; DEMIRBAG, Z. Characterization and toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from hazelnut pests and fields. **Pest Management Science**, Trabzon, v. 66, p. 543-548, 2010.

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

THOMAS, W. E.; ELLAR, D.J. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal-endotoxin: Effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. **Journal of Cell Science**, London, v. 60, p. 181-197, 1983.

VIANA, C. L. T. P.; DE BORTOLI, S. A.; THULER, R. T.; GOULAR, T. R. M.; THULER, A. M. G.; LEMOS, M. V. F.; FERRAUDO, A. S. Efeito de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner em *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae). **Científica**, Jaboticabal, v. 37, n. 1, p. 22-31. 2009.

VILLAS BÔAS, G.L.; CASTELO BRANCO, M.; MEDEIROS, M.A.; MONNERAT, R.G.; FRANÇA, F.H. Inseticidas para o controle da traça-das-crucíferas e impactos sobre a



população natural de parasitóides. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 4, p. 696-699, 2004.

XIE, L.; ZHANG, W.; LIU, Z.; CAI, Y.; YOUZHI, L.; FANG, X. Characterization of a new highly toxic isolate of *Bacillus thuringiensis* from the diapausing larvae of silkworm and identification of *cryIAc* gene. **Bt Research**, Nanning, v. 1, n. 1, p. 1-9. 2010.

## CAPÍTULO II

# COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE PLANTAS DE REPOLHO POR ESTIRPES BRASILEIRAS DE *Bacillus thuringiensis*

# COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE PLANTAS DE REPOLHO POR ESTIRPES BRASILEIRAS de *Bacillus thuringiensis*

## RESUMO

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria de grande importância como agente de controle biológico de pragas agrícolas, podendo ser isolada a partir de amostras coletadas em água, solo, plantas e insetos mortos. A habilidade de *B. thuringiensis* em colonizar endofiticamente as plantas de repolho cultivadas foi verificada através da inoculação de quatro estirpes de *B. thuringiensis* em diferentes híbridos de repolho no solo, inoculação de estirpes marcadas com radioisótopo em cultivo de plântulas *in vitro* e observação das plantas inoculadas em microscópio eletrônico de varredura. A habilidade de *B. thuringiensis* em colonizar plantas de repolho foi verificada através da presença de células vegetativas, esporos e cristais das três estirpes brasileiras de *B. thuringiensis* nas diferentes partes das plantas de repolho. A predominância de colonização de *B. thuringiensis* foi observada nas raízes. Foram visualizadas estruturas de *B. thuringiensis* na superfície das folhas, próximas aos estômatos e dentro dos poros estomáticos por microscopia eletrônica de varredura. Este estudo demonstrou pela primeira vez a habilidade de estirpes brasileiras de *B. thuringiensis* em colonizar plantas de repolho.

**Palavras-chave:** Bactéria, penetração, sistêmica, habilidade

## ENDOPHYTIC COLONIZATION BY BRAZILIAN STRAINS OF *Bacillus thuringiensis* ON CABBAGE PLANTS

### ABSTRACT

*Bacillus thuringiensis* is a very important bacteria used as biological control agent against agricultural pests. It may be isolated from soil, water, plants and dead insects. The ability of *B. thuringiensis* strains in colonize cabbage plants were verified by inoculations of four different strains of *B. thuringiensis* in different hybrids of cabbage in soil, inoculation of marked strains with radioisotope and observation of inoculated plants in scanning electron microscopy. The endophytic ability of *B. thuringiensis* to colonize plants was verified by the presence of vegetative cells, spores and crystals of the three Brazilian *B. thuringiensis* strains in different parts of cabbage plants. The colonization occurs mainly in roots. The colonization was shown on surface, near stoma leaves and inside stomach pores by scanning electron microscopy. This study demonstrates for the first time the ability of Brazilian *B. thuringiensis* strains to colonize cabbage plants.

**Key words: Bacteria, penetration, systemic, ability**

## 1 INTRODUÇÃO

As bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Agrobacterium*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter* e *Pseudomonas* são os microrganismos mais frequentes encontrados em associações endofíticas. A grande vantagem da colonização endofítica para os microrganismos é que os tecidos internos da planta proporcionam um ambiente protegido das adversidades do meio, tais como radiação ultravioleta, chuvas e flutuações extremas de temperatura, indisponibilidade de nutrientes, entre outros (SILVA *et al.*, 2006); além disso, esses organismos podem beneficiar as plantas ao promover seu crescimento e controlar biologicamente pragas.

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria de ocorrência cosmopolita (KRYWUNCZYK e FAST, 1980), sendo encontrada em vários substratos como solo, água, superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados, em todas as partes do mundo (BRAVO *et al.*, 1998). É uma bactéria gram-positiva e aeróbica, podendo facultativamente crescer em anaerobiose e é comumente utilizada no controle biológico de insetos. Esta característica se deve à presença de inclusões protéicas cristalinas, produzidas durante a esporulação (BRAVO *et al.*, 1998; MONNERAT e BRAVO, 2000). Esta espécie é muito sensível aos raios ultravioleta (BRAVO *et al.*, 2011), portanto sua utilização sistêmica na planta seria muito interessante do ponto vista agrônômico.

Embora *B. thuringiensis* seja encontrada nas plantas (MONNERAT *et al.*, 2003; MADUELL *et al.*, 2007), a forma como esta bactéria penetra nas mesmas ainda não é conhecida. Acredita-se que a bactéria respinge nas folhas pelas gotas da chuva e penetre pelos estômatos, mas no geral existem poucos estudos que demonstrem a habilidade de *B. thuringiensis* colonizar com sucesso plantas de forma a alcançar insetos do filoplano (MONNERAT *et al.*, 2009). Alguns estudos indicam que as espécies de *B. thuringiensis*

encontradas no solo e no filoplano são as mesmas, e que essas bactérias encontradas em folhas de repolho são algumas vezes transportadas para as folhas a partir do solo (BIZARRI e BISHOP, 2007; MADUELL *et al.*, 2007). Outros estudos demonstraram que a colonização por endofíticos parece começar com a migração de bactérias para locais onde sementes estejam germinando e raízes crescendo (HINTON e BACON, 1995). Um isolado de *Bacillus* e outro de *Pseudomonas* aplicados nas sementes de abeto (*Picea abis*) se movimentaram aploplasticamente, nos espaços intercelulares, sendo constatados em ramos, folhas e flores (SHISHIDO e CHANWAY, 1999), colonizando endofiticamente as plantas. No entanto os mecanismos de penetração e transporte não são bem conhecidos.

A ecologia de *B. thuringiensis* também é pouco conhecida. Para sua utilização de forma endofítica no controle de insetos-praga é importante conhecer a forma de colonização de *B. thuringiensis* em plântulas de repolho, para que possa ser utilizado no controle de insetos-pragas que vivem e se alimentam no interior dos tecidos das plantas.

O Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, vem desde 2003 (MONNERAT *et al.*, 2003), estudando uma nova forma de controlar *P. xylostella* utilizando *B. thuringiensis* na forma endofítica, visando proteger as culturas de repolho e outras Brássicas dessa importante praga de hábito críptico. O objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade de estirpes brasileiras de *B. thuringiensis* em colonizar e persistir em plantas de repolho por isolamento, radiomarcagem e microscopia eletrônica de varredura.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Foram realizados três ensaios: o primeiro para verificar a persistência de estirpes de *B. thuringiensis* em diferentes híbridos de repolho, o segundo para detectar as estirpes em diferentes partes da planta do repolho através de inoculação de estirpes marcadas com

radioisótopos e a terceira para detectar as estirpes nas estruturas do repolho através de microscopia eletrônica de varredura.

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Bactérias Entomopatogênicas, de Radioatividade, de Apomixia e de Microscopia Eletrônica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

## **2.1 Estirpes de *B. thuringiensis* e condições de crescimento**

Foram utilizadas quatro estirpes de *B. thuringiensis*: S1905, S2122 e S2124, provenientes do Banco de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a estirpe S1450 – *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* (Btk) – HD 1 como padrão.

As estirpes conservadas em tiras de papel filtro foram cultivadas em meio Embrapa (MONNERAT *et al.*, 2007), incubadas a 28° C, por 72 horas e 200 rpm. Os lotes de cada estirpe foram visualizados em microscópio óptico de contraste de fases com aumento de 1000X para observação de esporos e cristais.

## **2.2 Material vegetal**

Sementes de três diferentes híbridos de repolho (*Brassica oleracea* L. variedade *capitata*) Astro-Plus (Seminis), Sekai (Premium) e Red Dynasty (Seminis) foram utilizadas nas avaliações. As sementes foram cultivadas em mistura de solo (terra de subsolo, área lavada grossa, esterco curtido e calcário) adubada com NPK (10-10-10) para o ensaio de colonização e persistência de estirpes de *B. thuringiensis* em híbridos de repolho. Para os ensaios de detecção de estirpes de *B. thuringiensis* por radiomarcagem e microscopia, as

sementes foram cultivadas em meio MS solidificado com 0,7% de Agar e pH 5,8 (MURASHIGE e SKOOG, 1962).

## **2.3 Ensaios de colonização de *B. thuringiensis* em híbridos de repolho**

### **2.3.1 Ensaio 1 - Colonização e persistência de estirpes de *Bacillus thuringiensis* em diferentes híbridos de repolho**

Foram realizados três experimentos com os diferentes híbridos de repolho, um experimento para cada híbrido. Foram plantadas oito sementes por vaso (2 litros), em solo não estéril adubado e foram colocadas em casa de vegetação por 25 dias. As plantas foram molhadas a cada dois dias. Depois de 10 dias do plantio, foi feito o desbaste, deixando-se três plantas por vaso. Após 25 dias do plantio, os vasos foram transferidos para uma sala climatizada à temperatura de  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas.

Depois de 30 dias do plantio, as plantas foram tratadas com as diferentes estirpes de *B. thuringiensis* crescidas por 72 horas. Para cada estirpe foi aplicado um mL na base de cada uma das plantas de repolho sobre o solo, em dose única. Após uma semana da aplicação das bactérias, as avaliações da capacidade de colonização e persistência das diferentes estirpes de *B. thuringiensis* nos tecidos de repolho foram iniciadas e repetidas a cada quinze dias.

Para a avaliação, as plantas foram removidas do solo, lavadas em água corrente e desinfestadas com hipoclorito a 1% por 10 minutos e lavadas em água destilada estéril por três vezes. O solo e cada parte das plantas como raízes, caules e folhas foram pesados separadamente e macerados em 5 mL de solução de NaCl estéril (8,5 gramas por litro). Um mL de cada amostra foi colocado em dois tubos de polipropileno de dois mL. A primeira amostra foi submetida a choque térmico a 80°C por 12 minutos e 5 minutos em gelo, para



eliminar células vegetativas e deixar apenas os esporos. Enquanto na segunda, que não sofreu choque térmico, foi feita para verificar o crescimento vegetativo da bactéria. Em seguida foram realizadas diluições seriadas decimais. A partir das diluições, alíquotas de 10 µL das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , e  $10^{-3}$  das amostras com choque térmico e sem choque foram inoculadas em placas de Petri com meio Embrapa Seletivo com penicilina a uma concentração de 100 µg/mL. A leitura e contagem das colônias presentes nas placas foram realizadas após 12 a 16 horas de incubação em estufa a 30 °C. Em caso de detecção de alguma contaminação ou presença de alguma outra bactéria, as colônias de *B. thuringiensis* foram contadas e reinoculadas em meio Embrapa e crescidas por 72 horas para observação do crescimento bacteriano, ou seja, da presença de esporos e cristais de *B. thuringiensis* por microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x. Plantas de repolho sem nenhum tratamento foram utilizadas como testemunha.

Os cinco tratamentos (água, S1450, S1905, S2122 e S2124) foram dispostos na prateleira da sala de Interação planta/Bt/praga, inteiramente ao acaso, com um total de cinco tratamentos e três repetições para cada um dos híbridos. Esporos por grama de solo/raiz/caule/folha foram comparados por análise de variância seguida de teste de Student-Newman-Keuls para comparação de médias ou quando os dados não cumpriam as premissas necessárias foi usada análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Dunn com auxílio do programa SigmaStat (KUO *et al.*, 1992). Estas análises foram realizadas apenas para avaliação da persistência das estirpes de *B. thuringiensis* no solo e nas diferentes partes das plantas de repolho na última semana de cada um dos experimentos.

### 2.3.2 Ensaio 2 - Colonização repolho por estirpes de *B. thuringiensis* marcadas com radioisótopo -Metionina <sup>35</sup>S

Para o ensaio de marcação de estirpes de *B. thuringiensis* com Metionina <sup>35</sup>S, sementes de repolho foram desinfestadas superficialmente em etanol 70% por 5 minutos, e em hipoclorito de sódio 2 % adicionado de Tween 20 (0,01%) por 30 minutos. Após este período, as sementes foram lavadas por três vezes em água destilada estéril e foram transferidas para papel filtro autoclavado para retirar o excesso de água. Após a desinfestação, as sementes foram plantadas em tubos cônicos de 50 mL, contendo 15 mL de Meio MS e foram mantidas por 15 dias em sala de cultura a  $25 \pm 2$  °C, destes dias, três deles os tubos foram mantidos no escuro. Após 13 dias, as quatro estirpes bacterianas foram inoculadas separadamente em placas de Petri contendo meio Agar Nutritivo acrescido de Metionina <sup>35</sup>S a uma concentração de 10 µCi/µL, e mantidas a temperatura ambiente por 48 horas. Em seguida, as placas foram raspadas com uma pipeta Pasteur e a massa bacteriana de cada uma das estirpes foi misturada a cinco mL de tampão PBS. Destes cinco mL, um mL de cada uma das estirpes foi aplicado no pé das plantulas de repolho. Uma planta foi deixada como testemunha. Após cinco dias, as plantas foram retiradas do tubo, suas raízes foram limpas com papel absorvente e foram colocadas dentro de um papel celofane para secagem em secador de gel por uma hora. Depois de secas, as plantas foram acondicionadas em cassete de chumbo e, no escuro, expostas a um filme de autoradiografia por um período de 30 dias. Depois deste período, o filme foi imerso em solução reveladora, água e solução fixadora, em cada uma das soluções pelo tempo de 1 min. para observação da radiomarcação.

### 2.3.3 Ensaio 3 - Detecção da colonização de estirpes de *B. thuringiensis* nas estruturas do repolho através de microscopia eletrônica de varredura

Sementes de repolho foram desinfestadas de acordo com a metodologia descrita no ensaio 2. Após a desinfestação, as sementes foram tratadas com cada uma das quatro estirpes de *B. thuringiensis*. Água destilada estéril foi aplicada como o controle negativo. As sementes foram imersas em 10 mL de cada um dos tratamentos por 5 minutos, e transferidas para secar em placas de Petri com papel filtro. Depois de secas, as sementes foram inoculadas em placas de Petri com meio MS. Para a germinação das sementes, as placas foram incubadas em sala de cultura a  $25 \pm 2$  °C no escuro. Após três dias, as plântulas foram transferidas para frascos de vidro com meio MS, onde foram mantidas por mais 27 dias nas mesmas condições descritas acima com fotoperíodo de 12 h.

Depois de 30 dias, as plântulas foram preparadas para análise em microscópio eletrônico de Varredura. Amostras de raízes, caules e folhas das plantas cultivadas *in vitro* foram fixadas com glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 por 24 h a 4 °C. Após essa etapa, as amostras foram submetidas a três lavagens de 15 min. em tampão cacodilato 0,1 M, seguidas de imersão em solução de tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) a 2% em tampão cacodilato de sódio por 1 h. As amostras pós-fixadas em  $\text{OsO}_4$  foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M, por 2 vezes, a cada 10 min., e por 2 vezes em água destilada, a cada 5 min., logo após, submetidas a desidratação em série etanólica crescente de (30, 50, 70, 90 e 100% ) permanecendo por 10 minutos em cada uma das concentrações. As amostras foram lavadas três vezes por 20 min. em etanol a 100%. Em seguida, foram secas pelo método de ponto crítico do  $\text{CO}_2$ , em aparelho Baltec CPD 030 e após montagem em suporte metálico, recobertas por “sputtering” com aproximadamente 25 nm de ouro em

aparelho MED 010 da Balzers. As amostras devidamente preparadas e identificadas foram observadas ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Ensaio 1** - Colonização e persistência de estirpes de *Bacillus thuringiensis* em diferentes híbridos de repolho

As estirpes de *B. thuringiensis* inoculadas próximos às raízes das plantas de repolho foram isoladas de todas as partes das plantas de repolho e em todos os híbridos testados e no solo.

No híbrido Astro Plus, os maiores números de esporos por grama das estirpes de *B. thuringiensis* detectados no solo foram observados na 7ª e 9ª semanas após inoculação das diferentes estirpes em dose única (Figura 1 A), indicando que o solo é um meio natural complexo que influencia o crescimento, a multiplicação e a sobrevivência dos microrganismos (RANGASWAMI e OBLISAMI, 1967).

As maiores quantidades de esporo por grama de raízes das estirpes S1450 e S1905 foram detectadas na 9ª semana após inoculação de *B. thuringiensis*, enquanto para as estirpes S2122 e S2124 foram detectadas na 7ª semana (Figura 1 C). Com relação à detecção de células, as estirpes S1450 e S2124 apresentaram os maiores picos na 5ª e 11ª semanas, respectivamente (Figura 1D). Estas estirpes apresentaram uma quantidade de células por grama de raízes maior que a quantidade de esporos (Figura 1C), o que demonstra que provavelmente estas estirpes utilizaram dos exsudatos das raízes como meio de cultura para sua germinação e multiplicação. Além disso, a estirpe S2124 apresentou o maior número médio de esporos por grama de solo e de raízes na 11ª semana (Figura 1 A e C).

Com relação à colonização das folhas do híbrido Astro Plus, a estirpe S1450 foi a que mais rapidamente colonizou as folhas, o que pode ser visualizado pela quantidade de esporos/g de *B. thuringiensis* detectado em suas folhas na primeira semana após inoculação (Figura 1G). Esta mesma estirpe, além de colonizar as folhas de repolho, germinou e multiplicou-se nas mesmas. Este resultado pode ser visualizado pelo isolamento de uma quantidade de células superior à quantidade de esporos/g de folhas (Figura 1G e 1H). Resultado semelhante foi apresentado pela estirpe S2124, exceto no início do processo de colonização pelos esporos (Figura 1G). Estes resultados podem ser um ótimo indício para utilização sistêmica destas duas estirpes no controle de lagartas desfolhadoras como *P. xylostella*. No entanto em função da dificuldade de manutenção de altas quantidades de esporo durante a 2<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> semanas, é importante a avaliação da utilização de doses mais altas e com uma maior frequência para aumentar a capacidade inicial de colonização e estabelecimento destas estirpes nas plantas antes que as mesmas encontrem limitações de natureza biótica e abiótica ao seu desenvolvimento.

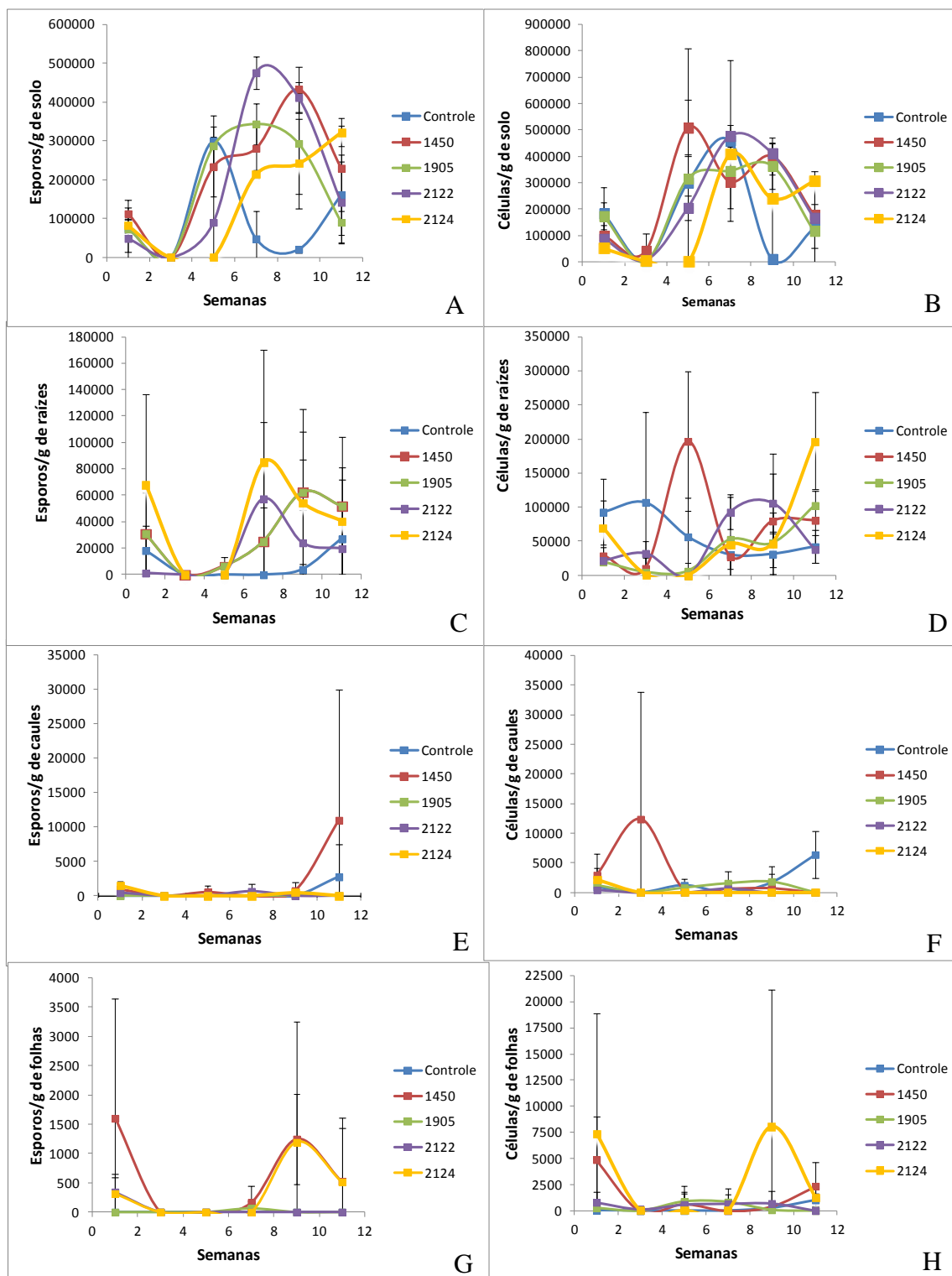


Figura 1 – Colonização de solo (A e B), raízes (C e D), caules (E e F) e folhas (G e H) de plantas de repolho do híbrido Astro Plus por estirpes de *B. thuringiensis* durante 11 semanas

A interação das estirpes S1905, S2122 e S2124 de *B. thuringiensis* com o híbrido Sekai apresentaram semelhança no perfil inicial de colonização dos esporos no solo, com

exceção da estirpe S1450 que apresentou um pico de colonização somente na terceira semana. Algumas estirpes apresentaram uma queda acentuada na capacidade de colonização nas duas semanas seguintes aos seus respectivos picos (Figura 2A). Este fato pode estar relacionado a vários fatores como à atividade dos microrganismos antagonistas e a ação de antibióticos (PEREIRA, 2000) sobre a população de *B. thuringiensis*, como também a presença de uma população nativa (controle) de células de *B. thuringiensis* no solo utilizado para o plantio das sementes de repolho (Figura 2B). Com relação à colonização das raízes pelas estirpes de *B. thuringiensis* inoculadas no solo, apenas a estirpe S2122 apresentou uma rápida colonização na 1ª semana após a inoculação e depois uma queda acentuada (Figura 2C e D), que se deve provavelmente ao fato da região das raízes ser extremamente influenciada pelos microrganismos rizosféricos, onde a colonização e o crescimento microbiano podem ser beneficiados ou inibidos (PEREIRA, 2000). Esta estirpe pode ter encontrado condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento neste ambiente que talvez pudesse ser melhorado através de doses mais altas e frequentes de *B. thuringiensis* nas inoculações, favorecendo a colonização dos esporos e células de *B. thuringiensis* nos caules e folhas das plantas de repolho logo na primeira semana após a inoculação.

Com relação à persistência, foram observadas diferenças estatísticas na persistência de esporos de *B. thuringiensis* nas raízes das plantas de repolho do híbrido Sekai (Figura 2A), mostrando que as estirpes S1450 e S1905 apresentaram valores de colonização (esporos/g) no solo superiores ao controle e às estirpes S2122 e S2124 (ANOVA:  $F = 7,713$ ;  $P = 0,004$ ). Os exsudatos radiculares contêm uma diversidade de compostos como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos, vitaminas e outros compostos biologicamente ativos (PEREIRA, 2000), que podem ter influenciado a colonização, crescimento e multiplicação de *B. thuringiensis* nas raízes das plantas de repolho. Este resultado indica que estas estirpes poderão futuramente ser utilizadas de forma sistêmica para

o controle de pragas de raiz, devido ao sucesso da colonizar das mesmas nas raízes de repolho, mesmo após nove semanas da inoculação em dose única e de apenas um mL.

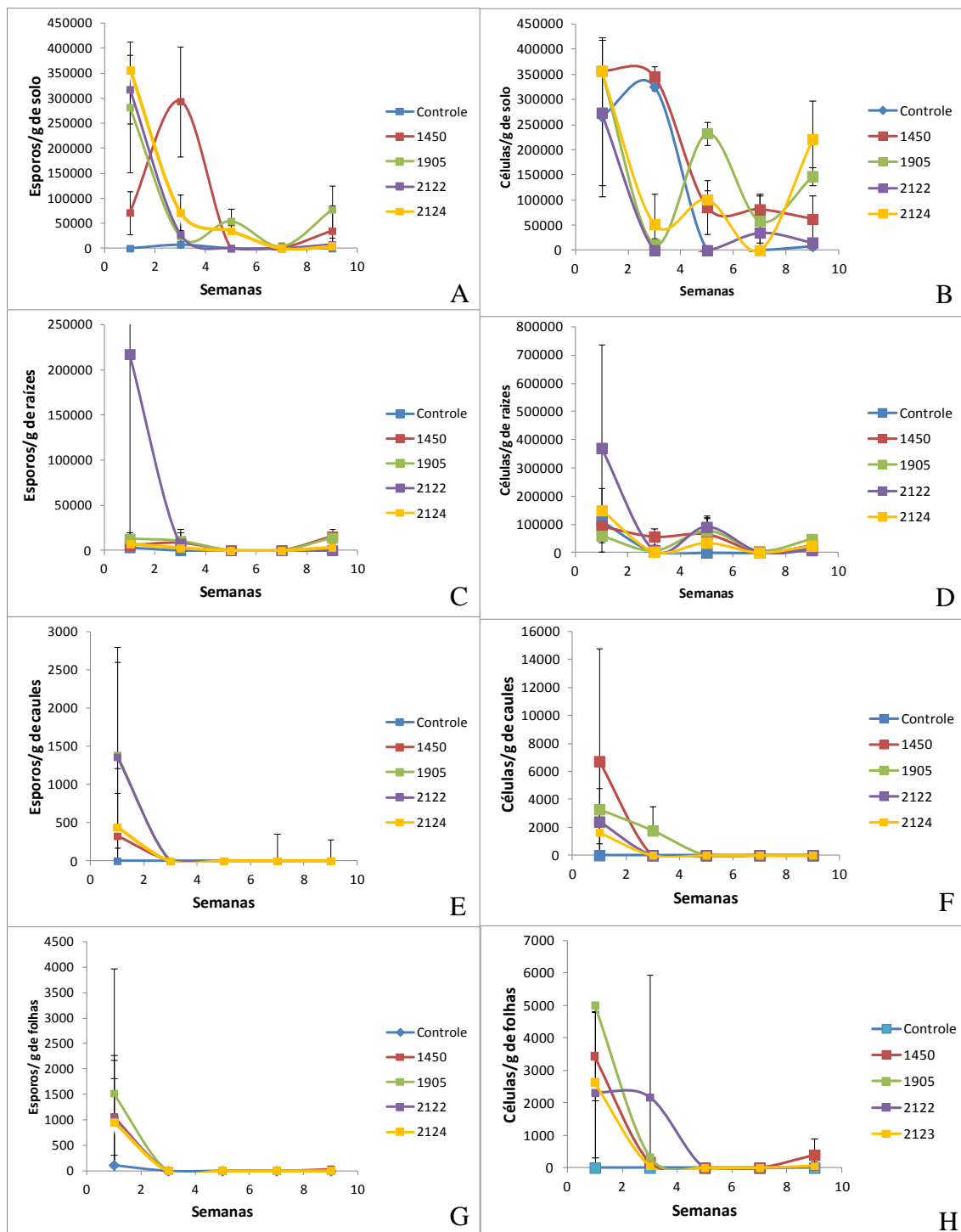


Figura 2 – Colonização de solo (A e B), raízes (C e D), caules (E e F) e folhas (G e H) de plantas de repolho do híbrido Sekai por estirpes de *B. thuringiensis* durante 9 semanas



O experimento com híbrido Red Dynasty foi conduzido por apenas sete semanas, em função de um ataque de mosca branca ocorrido durante o desenvolvimento das plantas e as mesmas não terem resistido aos danos ocasionados pelo ataque por um período mais longo.

No híbrido Red Dynasty, a estirpe S1450 apresentou um pico inicial de colonização do de esporos e células por grama de solo na 3ª semana após inoculação (Figura 3A e B) e todas as outras estirpes testadas apresentaram o maior pico de colonização pelas células de *B. thuringiensis* na 7ª semana (Figura 3A). A estirpe S1450 apresentou uma capacidade de colonização inicial maior que a capacidade das outras estirpes, além de um estabelecimento no solo com a mesma intensidade por cinco semanas seguidas (Figura 3A e B). Este mesmo comportamento não foi visualizado nas raízes (Figura 3 C e D), provavelmente em função da competição exercida por microrganismos antagonistas presentes nas raízes. Entretanto, depois de um período provável de adaptação a estirpe S1450 conseguiu voltar a crescer e multiplicar-se. Este resultado indica que esta estirpe provavelmente utilizou os exsudatos produzidos pelas raízes para seu crescimento e multiplicação nas raízes das plantas (Figura 3C). O mesmo foi observado para a estirpe S1905 o que pode ser observado pelo número de células/g isoladas das raízes de repolho na 5ª semana após a inoculação (Figura 3D).

Com relação ao híbrido Red Dynasty (Figura 3A), foram observadas diferenças estatísticas na persistência de esporos de *B. thuringiensis* no solo, mostrando que todas as estirpes apresentaram quantidades de esporos por grama de solo superior ao controle (Kruskal-Wallis:  $H = 14$ ;  $DF = 4$  e  $P = 0,007$ ).

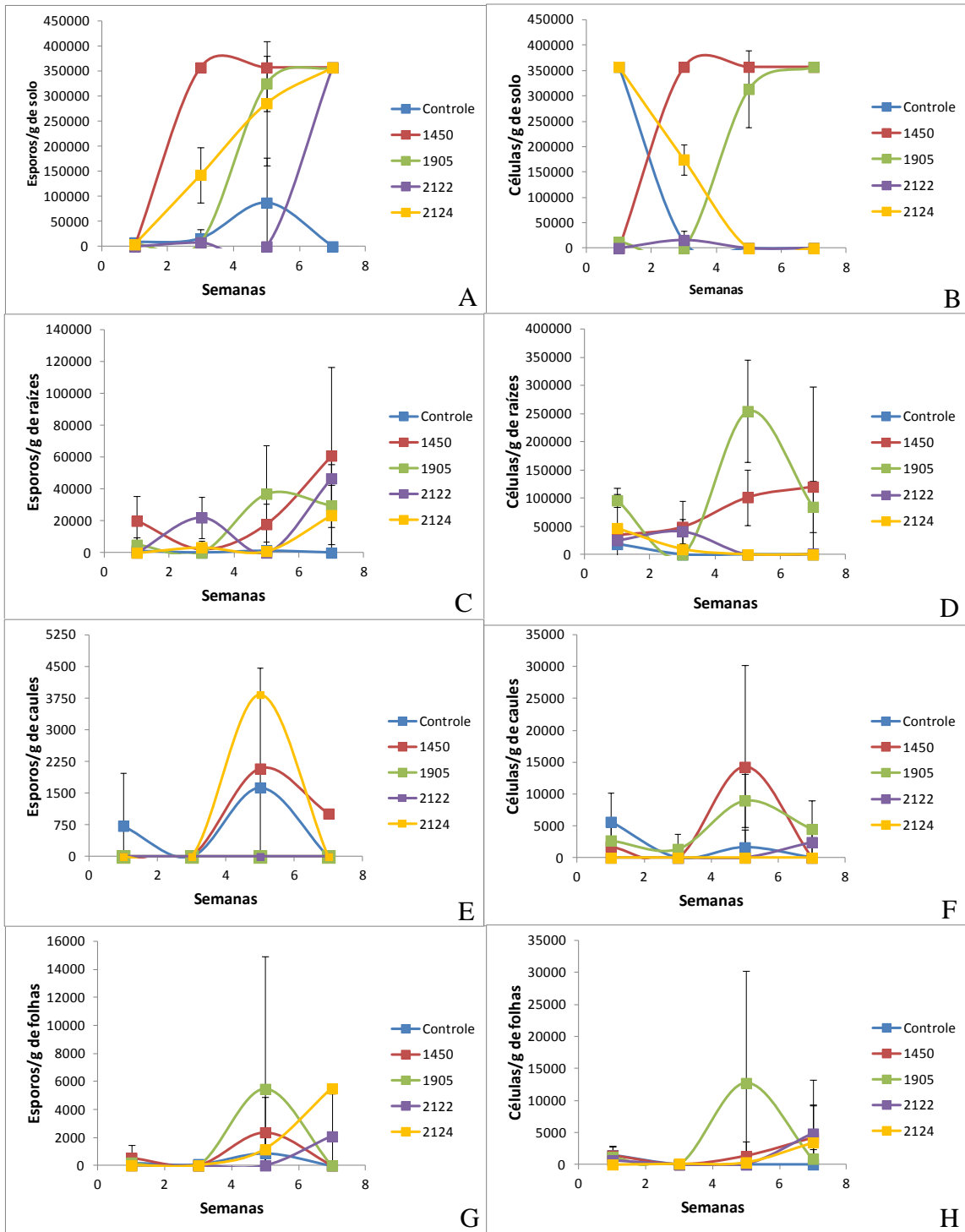


Figura 3 – Colonização de solo (A e B), raízes (C e D), caules (E e F) e folhas (G e H) de plantas de repolho do híbrido Red Dynasty por estirpes de *B. thuringiensis* durante 7 semanas

A relação entre a planta hospedeira com a comunidade endofítica envolve um processo de co-evolução regido pela sua colonização, que é influenciada pelo genótipo, estágio de

crescimento, *status* fisiológico, tipo de tecido da planta, práticas agrícolas, além de condições ambientais como temperatura, oferta de água e nutrientes (HARDOIM *et al.* 2008, COMPANT *et al.* 2010, DAVITT *et al.* 2011, GUNDEL *et al.* 2011).

A composição da comunidade associada às plantas pode, ainda, ser diferente, dependendo da espécie, do cultivar, e até mesmo entre espécies transgênicas e suas respectivas progenitoras (ANDREOTE *et al.* 2010).

Os resultados obtidos indicam que o híbrido Sekai apresentou resultados interessantes de colonização de raízes pelas estirpes S1450 e S1905. Estes resultados de colonização e persistência das estirpes abrem uma nova perspectiva para o controle de pragas de solo e mostram que as raízes promovem um ambiente propício ao desenvolvimento de microrganismos em função de exsudatos produzido pelas mesmas e, ainda, em função de *B. thuringiensis* ser uma bactéria que habita mais comumente o solo (FORSYTH e LOGAN, 2000; IBARRA *et al.*, 2003; MOHAMED *et al.*, 2007).

Estes resultados poderão ser utilizados para estudos futuros com aplicação de estirpes de *B. thuringiensis* marcadas para diferenciá-las das nativas, além de doses mais altas e com uma maior frequência visando intensificar a colonização de *B. thuringiensis* no solo, a penetração nas raízes pelas aberturas naturais, chegando até as folhas em uma maior concentração do que o observado neste trabalho, visando o controle de insetos desfolhadores, crípticos, endofíticos e de raízes. Estes testes serão de grande importância, já que a adesão de bactérias em plantas pode aumentar com o tempo e a concentração inicial do inóculo (REIS e OLIVARES, 2006).

## Ensaio 2 - Colonização repolho por estirpes de *B. thuringiensis* marcadas com radioisótopos

A bactéria marcada com metionina S<sup>35</sup> pôde ser detectada em todas as partes das plantas inoculadas. Entretanto, a radioatividade não foi detectada na planta testemunha tratada apenas com PBS, demonstrando mais uma vez a colonização de repolho por estirpes de *B. thuringiensis* (Figura 4). Resultados semelhantes de colonização por *B. thuringiensis* foram encontrados por Monnerat *et al.* (2009) em plantas de algodão e couve inoculadas com Btk marcado com metionina S<sup>35</sup>.



Figura 4 – Autoradiografia de plântulas de repolho depois de 5 dias de exposição às estirpes de *B. thuringiensis* (A - controle, B - S1450, padrão Btk, C - S1905, D - 2122 e E – S2124), mostrando a colonização de *B. thuringiensis* marcado com metionina S<sup>35</sup> nas raízes, caules e folhas de plântulas de repolho

**Ensaio 3** - Detecção de estirpes de *B. thuringiensis* nas estruturas do repolho através de microscopia eletrônica de varredura.

A observação das plântulas crescidas *in vitro* por microscopia de varredura, após 30 dias de inoculação das estirpes de *B. thuringiensis* nas sementes, permitiu visualizar células vegetativas, esporos e cristais de *B. thuringiensis* nas diferentes partes das plântulas. A visualização de células vegetativas de *B. thuringiensis* demonstra não apenas a adesão e penetração deste microrganismo em sementes de repolho, como também a infecção, multiplicação e o estabelecimento no interior das plântulas de repolho. Dessa forma ficou comprovada a colonização das diferentes partes das plântulas de repolho por *B. thuringiensis*.

A visualização de células vegetativas por microscopia de varredura significa que as bactérias podem ter utilizado substâncias da planta para se desenvolver e se manterem vivas nas plântulas. Segundo alguns relatos, os isolados que possuem maior habilidade na utilização de exsudatos de sementes possuem vantagem seletiva na colonização de raízes, por ocorrer liberação de carboidratos e aminoácidos em abundância na forma de exsudatos durante o processo de germinação das sementes (SUBRAHMNYAM *et al.*, 1983).

Pode-se inferir que depois da imersão das sementes de repolho em culturas bacterianas, as bactérias aderiram às sementes e, por aberturas naturais que ocorreram durante o processo de germinação e desenvolvimento das plântulas de repolho, penetraram e colonizaram os tecidos vegetais, sem causar danos às plântulas (Figura 5).

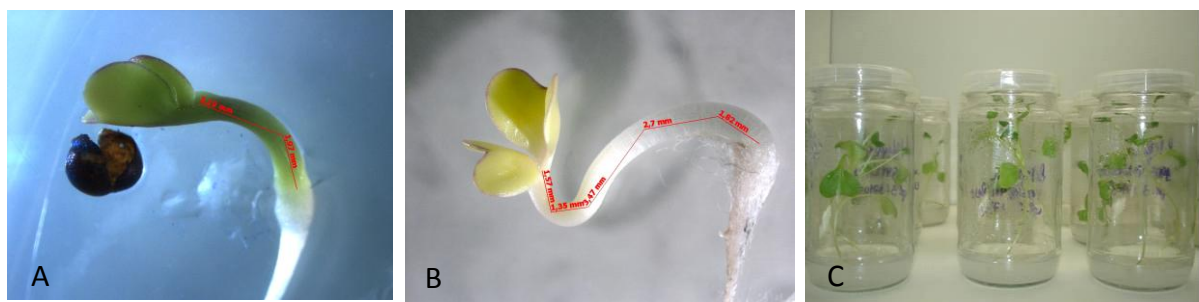


Figura 5 – Plântulas de repolho colonizadas por *B. thuringiensis* com aspecto normal.

A: plântulas controle com 3 dias; B: plântulas tratadas com o sedimento de *B. thuringiensis* e C: plântulas tratadas depois de 30 dias

As bactérias podem ter penetrado através dos pontos de emergência de raízes primárias (REIS e OLIVARES, 2006), como também durante o desenvolvimento das raízes laterais que cresceram na direção do córtex, rompendo a camada de células da epiderme e emergindo para o exterior. Grandes cavidades formadas durante este processo podem ter constituído sítios de infecção para as estirpes de *B. thuringiensis* como já foi observado em (PATRIQUIN *et al.*, 1983). A presença da bactéria não foi observada na amostra testemunha (Figura 6A).

A infecção nas raízes pode ocorrer também devido à abrasão com o meio de crescimento que promove a formação de feridas durante o processo de crescimento radicular. Estas feridas são muitas vezes a porta de entrada dos microrganismos nos vegetais (REIS e OLIVARES, 2006), fato já observado para *Gluconacetobacter diazotrophicus*, notando-se que grande número de bactérias acumulava-se nas regiões de ruptura de células da epiderme em raízes (JAMES *et al.*, 1994).

Nas primeiras micrografias eletrônicas de varredura das raízes, verificou-se a presença de rachaduras (Figura 6B) expondo esporos e cristais de *B. thuringiensis*. Nos cortes transversais de raízes, constatou-se a existência de uma crescente população de células bacterianas agregadas (Figura 6C), colonizando as células dos tecidos através da visualização de esporos e cristais (Figura 6D).

A colonização efetiva de células de *B. thuringiensis* na superfície radicular das plântulas de repolho demonstra a possibilidade desta bactéria exercer um efeito fisiológico sobre esta planta hospedeira, evento essencial para que este microrganismo possa atuar como promotor de crescimento.

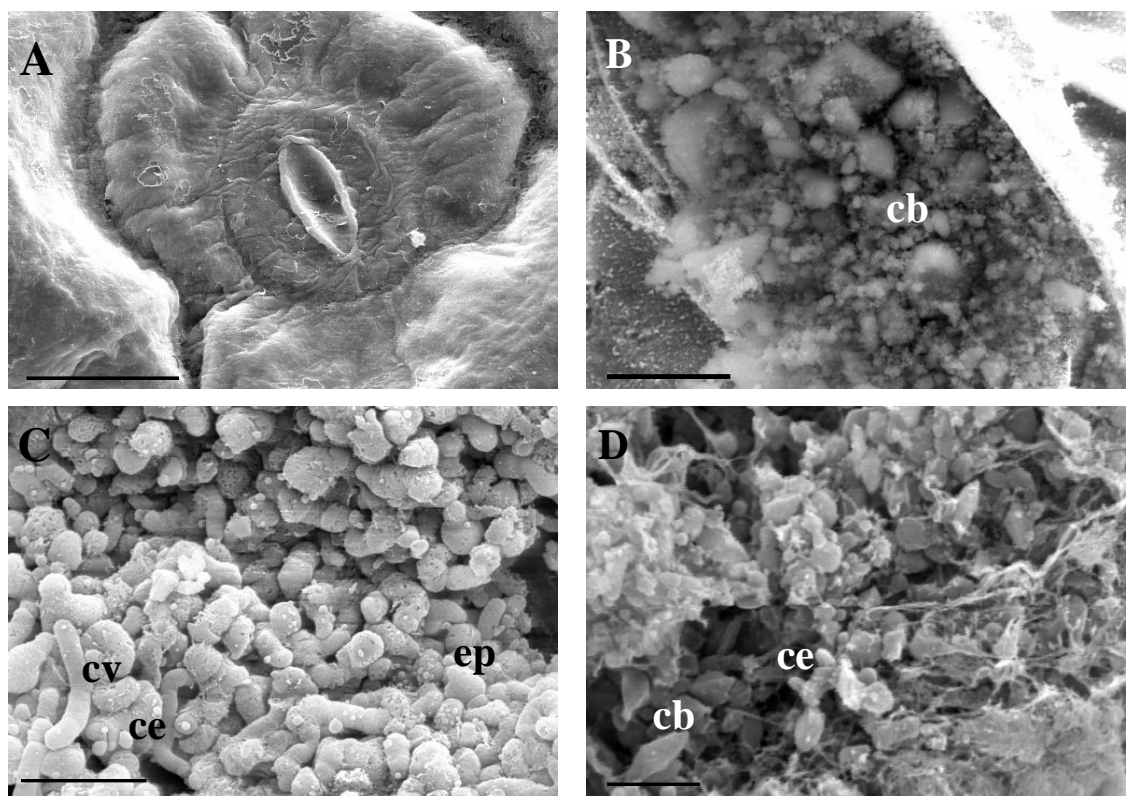


Figura 6 – Micrografia eletrônica de varredura mostrando a colonização de diferentes partes das plântulas de repolho por estirpes de *B. thuringiensis*. A – Folha de plântula de repolho testemunha sem colonização por *B. thuringiensis*; B - presença de rachaduras em raízes de plântula de repolho expondo esporos e cristais bipiramidais (cb) da estirpe S1905 de *B. thuringiensis*; C – Colonização de folhas de plântulas de repolho por células vegetativas (cv), cristais esféricos (ce) e esporos (ep) agregados da estirpe de *B. thuringiensis* S1905 e D - Colonização de raízes de plântulas de repolho por cristais bipiramidais (cb) e esféricos (ce) da estirpe *B. thuringiensis kurstaki* S1450. Barras: A = 10  $\mu\text{m}$ ; B = 5  $\mu\text{m}$ ; C = 5  $\mu\text{m}$  e D = 2  $\mu\text{m}$

Foi observada, também, a colonização da bactéria nos caules das plântulas de repolho, conforme figura 7A. Pode-se visualizar esporo de *B. thuringiensis* da estirpe S2124 colonizando estômato de caules, estrutura esta que pode ser visualizada apenas em caules jovens.

As observações das folhas de plântulas de repolho por microscopia eletrônica demonstraram a presença de células de *B. thuringiensis* nas depressões das células da

epiderme, poros estomáticos, nas células guardas dos estômatos e regiões próximas aos estômatos (Figura 7B). Resultados semelhantes foram encontrados por Silva-Neto *et al.* (2006) na penetração de *Acidovorax avenae* subespécie *citrulli* em folhas de Melão Amarelo via aberturas estomáticas.

Este trabalho com *B. thuringiensis* diferencia-se pelo tratamento das sementes de repolho em cultura bacteriana, em vez de pulverização nas folhas. Acredita-se que as bactérias tenham aderido à superfície das sementes, penetrado por aberturas naturais nas raízes ou injúrias durante o processo de germinação e crescimento radicular, e por fim colonizado as plântulas de repolho.

Provavelmente, condições favoráveis foram encontradas para que a colonização ocorresse aliadas à ausência de reações por parte dos tecidos das plantas (REIS e OLIVARES, 2006). Observou-se também a presença de esporos de *B. thuringiensis* no ostíolo (Figura 7 A e B), o que demonstra a saída de células bacterianas, comprovando mais uma vez que a câmara subestomática funciona como via de entrada e saída para as bactérias, fato já relatado por Oliveira *et al* (1993) para a bactéria *H. rubrisubalbicans* em cana-de-açúcar.

Apesar da interação entre plantas de repolho e *B. thuringiensis* não ser completamente conhecida, é possível que a bactéria atinja um sítio favorável e tenha habilidade de resistir à remoção, o que constitui uma vantagem seletiva (REIS e OLIVARES, 2006). Desta forma, esta espécie de bactéria poderá ter colonizado as raízes, os caules e as folhas, por aberturas naturais chegando à superfície das folhas (Figura 7B) de repolho via células estomáticas por evapotranspiração ou exsudação.

Foi possível observar a ocorrência destes eventos nas estirpes de *B. thuringiensis* S1905, S2122 e S2124 como também na estirpe padrão S1450 (Figuras 6 e 7). Estruturas de todas as estirpes de *B. thuringiensis* testadas foram visualizadas aderidas à superfície das



folhas e em suas depressões e concentradas ao redor dos estômatos, além de terem sido visualizadas, também, na câmara estomatal (Figura 7B).

As células bacterianas na maioria das vezes foram encontradas agregadas e muito raramente isoladas, predominantemente em áreas protegidas com flanges cuticulares ou depressões e ao redor dos estômatos ou mesmo no xilema (Figura 7C). Esses eventos já foram observados em relação a outros microrganismos como fitobacterioses e fixadores de nitrogênio (SILVA-NETO *et al.*, 2006; MATTOS *et al.*, 2008). Observou-se também o início da formação de fibrilas (Figura 7D), estrutura responsável pela aderência de bactérias a estruturas de repolho, interligando-as ao hospedeiro. Estudos desenvolvidos por Silva-Neto *et al.* (2006) e Campbell *et al.* (1987) observaram a presença de material fibrilar, proporcionando adesão à superfície de hospedeiros como o melão amarelo (*Cucumis melo*) e da canola (*Brassica napus* L. var. *oleífera*). O processo de adesão não é completamente conhecido, mas é considerado essencial no processo de infecção, pois auxiliam na adesão de bactérias a superfície de hospedeiros, auxiliando no processo de penetração e colonização.

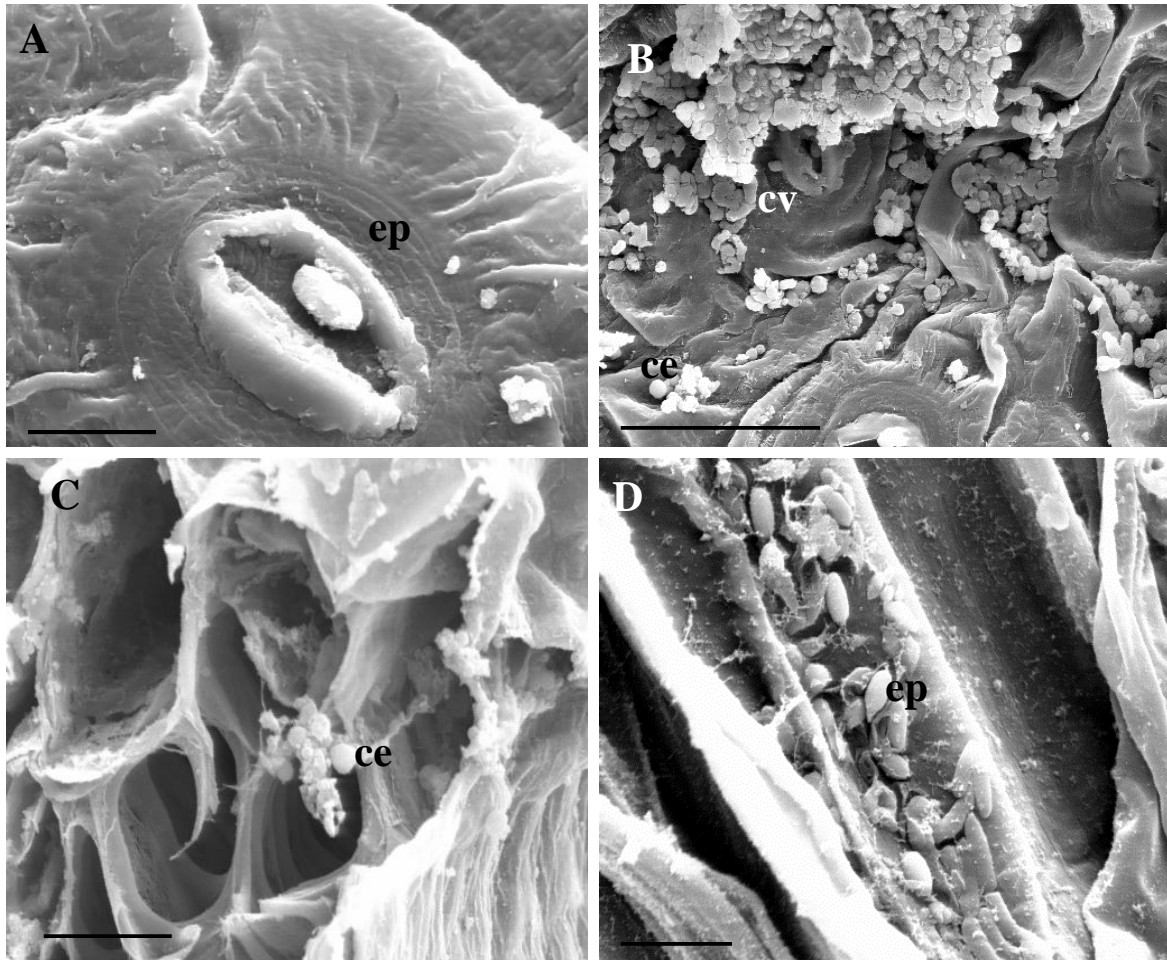


Figura 7 – Micrografia eletrônica de varredura mostrando a colonização de diferentes partes das plântulas de repolho por estirpes de *B. thuringiensis*. A – presença de esporo (ep) da estirpe S2124 de *B. thuringiensis* em estômato de caule de plântulas de repolho; B - Colonização de depressões de estômatos de folhas de repolho por células vegetativas (cv), esporos (ep) e cristais esféricos (ce) de *B. thuringiensis* S1905; C - células de *B. thuringiensis* S2122 no xilema de raízes de repolho; D – colonização de caules de plântulas de repolho por células de *B. thuringiensis* S2124 com início de formação de fibrilas nos esporos (ep) Barras: A = 5  $\mu\text{m}$ ; B = 20  $\mu\text{m}$ ; C = 5  $\mu\text{m}$  e D = 2  $\mu\text{m}$ .

Neste estudo, todas as estirpes de *B. thuringiensis* utilizadas apresentaram sucesso na colonização nas partes das plântulas de repolho, entretanto foi visto com mais abundância estruturas das estirpes S1450 e S1905 de *B. thuringiensis* (Figura 6C e D). Esta última é uma estirpe brasileira conhecida como tóxica a lagartas de insetos da Ordem Lepidoptera

(MONNERAT *et al.*, 2007; PRAÇA *et al.*, 2010). Estas estirpes foram visualizadas nas aberturas estomatais, produzindo células, esporos e cristais, demonstrando a germinação, esporulação e formação de cristais de *B. thuringiensis*. A observação da presença de *B. thuringiensis* em todas as partes das plântulas é de grande importância para este estudo, pois mostra a possibilidade de utilização de *B. thuringiensis*, no controle de pragas agrícolas desfolhadoras, insetos endófagos, sugadores, pragas de solo e vetores de fitopatógenos.

Através da microscopia foram observadas que as estirpes S1450 e S1905 são boas colonizadoras de plântulas de repolho, destacando-se pela intensa colonização em todas as partes das plântulas, como também pela presença de cristais bipiramidais, cubóides e esféricos, que são essenciais na toxicidade aos insetos pragas. Mesmo depois de 30 dias de tratamento das sementes, foram encontradas estruturas bacterianas como células vegetativas, esporos e cristais de *B. thuringiensis* em todas as partes das plântulas analisadas, o que comprova que *B. thuringiensis* penetra e coloniza tecidos de plântulas de repolho.

A microscopia eletrônica de varredura permitiu comprovar a penetração de *B. thuringiensis* nas raízes, caules e folhas de plântulas de repolho. Constatou-se que a metodologia de inoculação de *B. thuringiensis* em sementes foi apropriada, dando condições para as observações das estruturas da bactéria *B. thuringiensis* nos tecidos de plântulas de repolho. Este é a primeira demonstração da colonização de estirpes brasileiras de *B. thuringiensis* em tecidos de plântulas de repolho por microscopia eletrônica de varredura.

Esta colonização em plântulas de repolho é de grande importância para fortalecer a possibilidade de uso de *B. thuringiensis* endofítico no controle da traça-das-crucíferas que quando da formação da cabeça do repolho penetra no interior das mesmas, causando depreciação do produto e queda na produtividade. Estes resultados corroboram com os resultados de Monnerat *et al.* (2009) que detectaram a presença de *B. thuringiensis* nos

tecidos de plantas de algodão por várias semanas através da contagem de células quando estas foram tratadas com Btk – HD 1.

As sementes e as raízes são consideradas os principais meios de disseminação de microrganismos, portanto mecanismo de disseminação de *B. thuringiensis* por estas vias deverão ser mais bem elucidados visando aprimorar este meio de inoculação como forma de controle de algumas pragas agrícolas que vivem no interior de plantas de grande importância econômica no Brasil e no mundo.

#### **4 CONCLUSÕES**

As estirpes colonizaram raízes, caules e folhas das plantas de repolho e a estirpe S1905 apresentou resultados superiores de colonização de raiz das plantas do híbrido Sekai. Novos estudos deverão ser conduzidos com estirpes marcadas com genes de *gfp* ou de melanina para avaliar a colonização em plantas de repolho do híbrido Sekai e desta forma evitar a influência da microbiota nativa sobre os resultados.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ANDREOTE, F.D., ROCHA, U.N., ARAÚJO, W.L., AZEVEDO, J.L. & OVERBEEK, L.S. van. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, p. 389-399, 2010.

BIZARRI, M. F.; BISHOP, A. H. Recovery of *Bacillus thuringiensis* in vegetative form from the phylloplane of clover (*Trifolium hybridum*) during a growing season. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 94, p. 38-47, 2007.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S. SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry**, v. 41, n.7, 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 Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n.12, p. 4965-4972, 1998.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 669-678. 2010.

CAMPBELL, J.N.; CASS, D. D.; PETEYA, D. J. Colonization and penetration of intact canola seedling roots by opportunistic fluorescent *Pseudomonas* sp. and the response of host tissue. **Phytopathology**, v. 77, p. 1166-1173, 1987.

DAVITT, A. J.; CHEN, C.; RUDGERS, J. A. Understanding context-dependency in plant–microbe symbiosis: The influence of abiotic and biotic contexts on host fitness and the rate of symbiont transmission. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 137-145. 2011.

FORSYTH, G.; LOGAN, N.A. Isolation of *Bacillus thuringiensis* Northern Victoria land, Antarctica. **Letters and Environmental Microbiology**, v. 30, p. 263-266, 2000.

GUNDEL, P.E., GARIBALDI, L.A., MARTÍNEZ-GHERSA, M.A.; GHERSA, C.M. *Neotyphodium* endophyte transmission to *Lolium multiflorum* seeds depends on the host plant fitness. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 359-366, 2011.

HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends Microbiology**, v. 16, p. 463–471. 2008

HINTON, D. M.; BACON, C. W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 129, p. 117-125, 1995.

IBARRA, J.E.; RINCÓN, M.C.; ORDÚZ, S.; NORIEGA, D.; BENITENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C.M.F.; LANZ, H.; RODRIGUES, M.H.; JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, p. 757-766, 1994.

KRYWUNCZYK, J.; FAST, P. G. Sorological relationships of the crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 36, p. 139-140, 1980.

KUO, J., FOX, E., MACDONALD, S. **Sigmastat: statistical software for working scientists**. Users manual. Jandel ScientiWc, San Francisco, CA, 1992.

MADUELL, P.; ARMENGOL, G.; LIAGOSTERA, M.; LINDOW, S.; ORDUZ, S. (2007). Immigration of *Bacillus thuringiensis* to bearn leaves from soil inoculum or distal plant parts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2593-2600, 2007.

MATTOS, K. A.; PÁDUA, V. L. M.; ROMEIRO, A.; HALLACK, L. F.; NEVES, B. C.; ULISSES, T. M. U.; BARROS, C. F.; TODESCHINI, A. R.; PREVIATO, J. O.; PREVIATO, L. M. Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 3, p. 477-493. 2008.

MOHAMED, E.A.M.; ABE, M.; GHANEM, K.M.; ABDEL-FATTAH, Y.R.; NAKAGAWA, Y.; EL-HELOW, E.R. Diversity of *Bacillus* Genotypes in soil samples from El-omayed biosphere reserve in Egypt. **Journal of Culture Collections**, 5: 78-84, 2007.

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.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: **Controle Biológico**, eds. Melo, I.S. e Azevedo, J.L, Jaguariúna, SP, 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, 4p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Comunicado técnico, 98), 2003.

MONNERAT, R. G. ; SOARES, C. M. S. ; GOMES, A. C. M. ; JONES, G. ; MARTINS, E. ; PRAÇA, L.; BERRY, C. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* bacteria living inside of plants. **Microbial Biotechnology**, 2: 1560-1562, 2009.

MURASKIGE, T.; SKOOG, F. K. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. **15** : 473-497, 1962.

OLIVEIRA, M. M. **Aplicações e avanços na área de biotecnologia vegetal**. Disponível em: [http://dequim.ist.utl.pt/bbio/66/pdf/Aplicacoes\\_e\\_Avanços\\_na%20Biotec\\_Vegetal.pdf](http://dequim.ist.utl.pt/bbio/66/pdf/Aplicacoes_e_Avanços_na%20Biotec_Vegetal.pdf). 2006. Acesso em: Jun 2010.

PRACA, L. B.; RAMOS, F. R.; RAMOS, F. R.; WAGNER, F. O.; SOARES, C. M. S.; SUJII, E.; MONNERAT, R.G. Suscetibilidade da traça-das-crucíferas a *Bacillus thuringiensis* em repolho no Distrito Federal. **Universitas**. Ciências da Saúde (UNICEUB. Impresso), v. 8, p. 17-31, 2010.

PATRIQUIN, D. G.; DOBREINER, J.; JAIN, D. K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 900-915, 1983.

PEREIRA, J. C. **Interações entre as Populações de Actinomicetos e outros Organismos na Rizosfera.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000.15p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 118).

RANGASWAMI, G.; OBLISAMI, G. A study of the correlation between the antagonistic actinomycetes and the physical and chemical properties of some soils of south India. **Indian Phytopatology**, New Delhi, v. 20, p. 280-290, 1967.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L. **Vias de Penetração e Infecção de Plantas por Bactérias.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 34 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 216).

SHISHIDO, M.; CHANWAY, C.P. Spruce growth response specificity after treatment with plant growth promoting *Pseudomonas*. **Canadian Journal of Botany**, v.77, n.1, p.22-31, 1999.

SILVA, H. S. A.; BETTIOL, W.; TERRASAN, C. R.VF.; TOZZI, J. P. L.; DE MELO, I. S.; NUNES, V. F. **Microrganismos Endofíticos: potencial de uso como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. 25 p. (Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 38).

SILVA NETO, E. B. SILVEIA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; NOGUEIRA, N. L.; ROSSI, M. L.; SANTOS, L. A. Penetração e Colonização de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em Folhas, Frutos e Sementes de Melão Amarelo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 84-88. 2006.

SUBRAHMANYAN, P.; REDDY, M. N.; RAO, A. S. Exudation of certain organic compounds from seeds of groundnut. **Seed Science and Technology**, 11 (2): 267-272, 1983.



## **CAPÍTULO III**

# **POTENCIAL DE *Bacillus thuringiensis* COMO PROMOTOR DO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE REPOLHO CULTIVADAS *IN VITRO***

## **POTENCIAL DE *Bacillus thuringiensis* COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE REPOLHO CULTIVADAS *IN VITRO***

### **RESUMO**

*Bacillus thuringiensis* (Bt) é um dos microrganismos mais conhecidos no controle de pragas, mas pouco estudado como endofítico e promotor de crescimento. Com o objetivo de investigar o efeito de Bt sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de repolho (*Brassica oleracea* variedade *capitata* L), quatro estirpes de Bt foram crescidas por 48 horas e avaliadas quanto ao seu efeito promotor de crescimento. Em seguida, uma estirpe de Bt, S1905, foi selecionada e novos ensaios foram realizados para avaliar o efeito desta sobre as plântulas. Esta estirpe foi crescida por 24 e 48 h em meio de cultura, em seguida o sedimento, o sobrenadante e o caldo fermentado foram utilizados para tratamento das sementes por imersão durante cinco e 15 min. No último experimento, as sementes foram imersas nos diferentes tratamentos por 30 min. As sementes foram inoculadas em placas de Petri com meio MS. Após três dias, foram analisados o percentual de germinação das sementes e o tamanho das plântulas. Após 30 dias, o peso fresco e seco das plântulas, número de folhas, comprimento da raiz e altura da parte aérea foram analisados. Os resultados dos experimentos com cinco e 30 min. mostraram que os diferentes tratamentos, sedimento, sobrenadante e caldo fermentado, não afetaram a germinação nem o desenvolvimento das plântulas de repolho. Entretanto, o tratamento sedimento, obtido após 48 horas de crescimento bacteriano, inoculado nas sementes por 15 minutos, apresentou um incremento de 200% no tamanho das plântulas, quando comparada com a testemunha. Os resultados ressaltam a importância de Bt como microrganismo multifuncional, possibilitando maior produção e qualidade das plântulas de repolho, além de protegê-las contra os insetos-praga.

**Palavras-chave: bactéria, multifuncional, endofítico, brassicaceae**

## **POTENTIAL OF *Bacillus thuringiensis* IN GROWTH PROMOTING OF CABBAGE SEEDLINGS *in vitro***

### **ABSTRACT**

*Bacillus thuringiensis* (Bt) is a microorganism well known as pests control, but little information about endophytic behavior and plant growth promoter are known. To investigate the Bt effect in the germination and development of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L) seedlings, four strains of Bt previously selected for its activity against *P. xylostella* were evaluated about its effect in plant growth promotion. One strain selected was grown for 24 and 48 hours in culture medium and its sediment, supernatant and mixture of both were used in seeds treatment by immersion during 5 and 15 minutes. For the last experiment, seeds were immersed for 30 min using the selected treatments. The treated seeds were inoculated into Petri dishes containing MS medium. After three days, seedlings were transferred to glass flasks and cultivated by 30 days. Seedlings were evaluated in relation to germination percentage and seedlings length. After 30 days, fresh and dry weights were taken, the number of leaves was counted, and the length of roots and aerial part were measured. The results showed no differences in the treatments with 5 and 30 minutes. In the treatment with 15 minutes, the sediment of S1905 of 48 hours showed a plant growth promotion, 200 times greater than the control. This treatment showed the potential of Bt as multifunctional microorganism that could be used to improve the production and quality of cabbage seedlings and also as a systemic bioinsecticide to control pests.

**Key words: bacteria, multifunctional, endophytic, brassicaceae**

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas são colonizadas por uma diversidade de microrganismos endofíticos, bactérias e fungos, os quais estabelecem relações benéficas com seus hospedeiros. Esta interação pode muitas vezes promover o crescimento das plantas e aumentar sua resistência a doenças e pragas (SILVA e BETTIOL, 2009), quando esses microrganismos são inoculados nas sementes, no solo ou nas raízes.

A capacidade de colonização dos tecidos vegetais por organismos endofíticos está relacionada a diversos fatores, como a interação entre o genótipo do vegetal e do microrganismo, estágio de crescimento, *status* fisiológico, tipo de tecido da planta, práticas agrícolas, além de condições ambientais como temperatura, umidade e nutrientes (DONG *et al.*, 1995, HARDOIM *et al.* 2008, COMPANT *et al.* 2010, DAVITT *et al.* 2011). Esta interação entre as bactérias, como as espécies do gênero *Bacillus* são conhecidas por promoverem o crescimento vegetal, apesar deste gênero ser considerado de vida livre (BENIZRI *et al.*, 2001).

O crescimento vegetal pode ser induzido de forma direta pela produção de fitormônios, ou mecanismos indiretos, como a supressão de microrganismos deletérios do ambiente endofítico através de mecanismos de competição ou antibiose. Além da indução de resistência sistêmica nas plantas, pela modificação da microbiota rizosférica, fixação de nitrogênio, produção de sideróforos, solubilização de fósforo ou outros nutrientes, e aceleração dos processos de mineralização (CATELLAN, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2003; BENEDUZI *et al.*, 2008). Muitas bactérias, como as rizobactérias, induzem o crescimento radicular, a formação de raízes laterais e pêlos radiculares. O sobrenadante ou precipitado destas bactérias podem estimular ou inibir o crescimento das plantas, em função da interação

entre o genótipo da bactéria e da planta hospedeira (SABINO *et al.*, 2000) e por serem fontes de metabólitos secundários (KARADENIZ *et al.*, 2006).

*Bacillus thuringiensis* (Bt) é um dos microrganismos mais conhecidos no controle de pragas, mas pouco conhecido como endofítico e promotor de crescimento. Este trabalho teve como objetivo investigar a capacidade de estirpes de Bt em promover o crescimento de plântulas de repolho (*Brassica oleracea* variedade *capitata* L) cultivadas *in vitro*, selecionar uma das estirpes e avaliar o efeito sobre a germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas de repolho e com relação a atividade contra *Plutella xylostella* e os possíveis mecanismos envolvidos na promoção do crescimento vegetal.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Foram realizados dois tipos de avaliações: efeito de Bt na germinação das sementes e no desenvolvimento das plântulas e avaliação da estirpe S1905 como promotora de crescimento de plântulas de repolho. Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Bactérias Entomopatogências e de Apomixia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

### **2.1 Estirpes de *B. thuringiensis***

Foram utilizadas quatro estirpes de *B. thuringiensis*: S1905, S2122 e S2124 ativas a insetos da ordem Lepidoptera, provenientes da Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a estirpe S1450 – *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* (Btk) padrão HD-1.

## 2.2 Material vegetal

Sementes de repolho do híbrido Seaki foram utilizadas nos ensaios de avaliação do efeito de promoção de crescimento das estirpes de Bt em plântulas de repolho cultivadas *in vitro*.

## 2.3 Efeito de Bt na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas

As quatro estirpes bacterianas foram crescidas em meio Embrapa (MONNERAT *et al.*, 2007) a 28 ° C, por 48 horas a 200 rpm (Incubador Rotativo 3526, Labline). Uma gota com cada uma das estirpes foi visualizada em microscópio óptico de contraste de fases com aumento de 1000x para observação de esporos e cristais. Em seguida, 10 mL de cada uma das estirpes foram utilizados para o tratamento das sementes.

Sementes de repolho foram desinfestadas superficialmente em etanol 70% por 5 min., e em hipoclorito de sódio 2% adicionado de Tween 20 (0,01%) por 30 min. Após este período, as sementes foram lavadas por três vezes em água destilada esterilizada, e foram transferidas para papel de filtro autoclavado para a retirada do excesso de água.

Após a desinfestação, as sementes foram separadas em seis lotes contendo cada um 18 sementes. As sementes de cada lote foram tratadas com cada uma das quatro estirpes de *B. thuringiensis*, água destilada esterilizada e meio Embrapa (utilizados como testemunhas) com um total de seis tratamentos com 18 repetições para cada tratamento.

As sementes foram imersas em 10 ml de cada um dos seis tratamentos por 5 minutos e transferidas para secar em placas de Petri com papel filtro e depois de secas foram inoculadas em placas de Petri com meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) solidificado com 0,7% de Agar e pH 5,8. Foram colocadas seis sementes por placa. Para germinação das sementes, as

placas foram incubadas em sala de cultura a  $25 \pm 2$  °C no escuro. Os tratamentos foram dispostos na prateleira da sala de cultura, de forma inteiramente casualizada, em um total de seis tratamentos (água, meio Embrapa, as estirpes de *B. thuringiensis* S1905, S2122, S2124 e a estirpe padrão S1450) com 18 repetições para cada tratamento.

Após três dias, as plântulas foram transferidas para frascos de vidro com meio MS, onde foram mantidas por mais 27 dias, com fotoperíodo de 12h. Das 18 plântulas de cada tratamento dez foram selecionadas e deixadas como repetição para cada tratamento.

#### **2.4 Avaliação do desenvolvimento das plântulas de repolho**

As plântulas foram avaliadas em duas ocasiões, aos três dias, quanto ao percentual de germinação das sementes e tamanho das plântulas, e aos 30 dias. Na primeira etapa de avaliação, as plântulas germinadas foram medidas com auxílio do microscópio estereoscópico V8, utilizando-se o programa AxioVision, ambos da Zeiss. Na segunda etapa, as plântulas foram retiradas individualmente do meio, com cuidado para não danificar as raízes, e foram lavadas em água para retirar o meio, e secas com papel absorvente. Após este procedimento, cada uma das plântulas foi pesada, o número de folhas foi contado e o comprimento das raízes e a altura da parte aérea foram medidos. Após secagem em estufa a 50 °C por 16 horas, cada plântula foi pesada novamente para determinar o peso seco. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ou foi usada análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Dunn com auxílio do programa SigmaStat (KUO *et al.*, 1992).

A estirpe que apresentou os melhores resultados foi selecionada para a continuidade dos trabalhos.

## **2.5 Efeito da estirpe de Bt S1905 na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de repolho**

Três experimentos foram conduzidos para a avaliação do efeito promotor de crescimento em plântulas de repolho.

Para a realização do experimento 1, a estirpe S1905 foi crescida em meio Embrapa a 28 ° C, por 24 e 48 horas a 200 rpm (Incubador Rotativo 3526, Labline). Uma gota com cada uma das estirpes foi visualizada em microscópio óptico de contraste de fases com aumento de 1000x para observação de esporos e cristais. Em seguida, 10 mL de cada um dos cultivos foram separados para o tratamento das sementes e o restante do crescimento bacteriano foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 min., a 4° C (centrífuga BR4i, Jouan). Em seguida, os sobrenadantes foram transferidos para tubos Falcon de 50 mL e filtrados em membrana Millipore GV 0,45 µm. Os sedimentos foram ressuspensos em 10 mL de água destilada estéril.

Antes do tratamento, as sementes de repolho foram desinfestadas superficialmente em etanol 70% por 5 min., e em hipoclorito de sódio 2% adicionado de Tween 20 (0,01%) por 30 min. Após este período, as sementes foram lavadas por três vezes em água destilada esterilizada, e foram transferidas para papel de filtro autoclavado para a retirada do excesso de água.

Após a desinfestação, as sementes foram separadas em sete lotes contendo cada um 30 sementes. No primeiro experimento, cada lote de 30 sementes foi imerso por cinco minutos em diferentes tratamentos (sobrenadante filtrado, sedimento bacteriano e bactéria total) com a bactéria crescida por 24 ou 48 horas e água destilada estéril como testemunha. As sementes foram imersas em 10 ml de cada um dos sete tratamentos por 5 minutos e transferidas para secar em placas de Petri com papel filtro. Depois de secas, as sementes foram inoculadas em



placas de Petri com meio MS. Foram colocadas seis sementes por placa. Para a germinação das sementes, as placas foram incubadas em sala de cultura a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  no escuro. Os tratamentos foram dispostos na prateleira da sala de cultura, inteiramente ao acaso, em um total de sete tratamentos com 30 repetições cada.

Após três dias, as plântulas foram transferidas para frascos de vidro com meio MS, onde foram mantidas por mais 27 dias, com fotoperíodo de 12h.

O segundo experimento foi realizado de maneira similar, porém o tempo de imersão das sementes foi de 15 minutos.

Depois de realizado os dois experimentos mencionados acima, os tratamentos com os melhores resultados foram selecionados e um terceiro experimento foi realizado com a bactéria crescida por apenas 48 horas. O sobrenadante filtrado, o sedimento e a bactéria total, todos foram utilizadas nos tratamentos das sementes por 30 min e foi incluído mais um tratamento, o sobrenadante não filtrado.

A avaliação dos diferentes tratamentos com a estirpe S1905 foi realizada conforme item 2.4.

## **2.6 Bioensaio contra *Plutella xylostella***

Foram realizados bioensaios para avaliar o efeito de plântulas provenientes do tratamento de suas sementes com *B. thuringiensis* no controle de *P. xylostella*. As lagartas de *P. xylostella* foram criadas no laboratório da Plataforma de criação de insetos da Embrapa, em dieta natural a base de folhas de couve previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio 0,5%, a temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 10\%$  de umidade relativa e fotoperíodo de 12 horas (MEDEIROS *et al.*, 2003).

Os bioensaios foram realizados, utilizando-se frascos com plântulas de repolho cultivadas *in vitro* do experimento 3, provenientes dos tratamentos sedimento, sobrenadante, sobrenadante filtrado e bactéria total, todos da estirpe S1905, e plântulas do tratamento testemunha. Dez lagartas de terceiro instar de *P. xylostella* foram colocadas em cada frasco com três repetições para cada tratamento. Os frascos foram fechados e colocados na sala de bioensaios, regulada sob as mesmas condições de temperatura e umidade da sala de criação do inseto. A leitura foi realizada no quinto dia do ensaio (96 horas), e a mortalidade total das lagartas foi avaliada.

## **2.7 Avaliação da capacidade da estirpe S1905 em sintetizar ácido indolacético, produzir sideróforos, solubilizar fosfato e fixar nitrogênio**

A produção de auxina foi medida através da produção de ácido 3-indol acético (AIA) conforme Asghar *et al.* (2002). A estirpe bacteriana foi crescida a 28 °C e 200 rpm durante 6 dias em três meios: meio Embrapa, meio King B (KING *et al.*, 1954) e meio DYGS (DÖBEREINER *et al.*, 1995), suplementado com triptofano a 2,5 mM. A cada 24 horas, uma alíquota de um mL da cultura bacteriana foi retirada e centrifugada em centrífuga Mikro 200 Hettich a 13000 rpm por 2 minutos. 500 µL do sobrenadante da cultura bacteriana foram retirados e misturados a 500 µL do reagente de Salkowski (2 ml 0,5 M FeCl<sub>3</sub> + 98 ml HClO<sub>4</sub> a 35%). A mistura foi deixada no escuro à temperatura ambiente por 30 min para o desenvolvimento da cor rosa-avermelhada. Após 30 minutos, a intensidade da cor foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 535 nm e uma curva padrão de AIA foi determinada e utilizada para a calibração (SARWAR e KREMER, 1995).

Para o teste de produção de sideróforos, a estirpe bacteriana foi crescida por 48 horas em um meio deficiente em ferro: meio líquido King B diluído cinco vezes. Após esse período,

a estirpe foi inoculada em placas de Petri, contendo meio King B sólido, suplementado com o complexo cromo azurol S [CAS/iron(III)/hexadeciltrimethyl ammonium bromide] (SCHWYN e NEILANDS, 1987) e incubada por 7 dias a 30 °C. A estirpe bacteriana que cresceu no meio e apresentou um halo amarelo em volta da colônia, foi considerada (+) para a produção de sideróforos ou quando não apresentou halo foi considerada (-) para a produção de sideróforos.

Para avaliar a capacidade de solubilizar fosfato, a estirpe bacteriana foi crescida em meio GY (10 g de glicose, 2 g de extrato de levedura e 15 g de Agar por litro), acrescido de duas soluções estéreis. As soluções foram preparadas separadamente, uma contendo 5 g de  $K_2HPO_4$  em 50 mL de água destilada e a outra 10 g  $CaCl_2$  em 100 mL de água destilada. Estas soluções foram misturadas a um litro do meio GY antes que as placas fossem vertidas, formando fosfato de cálcio insolúvel que tornou o meio opaco. A bactéria foi inoculada no meio por sete dias a 30 °C. A estirpe bacteriana que apresentou halos visíveis de clareamento foi considerada solubilizadora de fosfato (SYLVESTER-BRADLEY *et al.* 1982).

Para avaliar a fixação biológica de nitrogênio, a estirpe bacteriana foi crescida em meio Embrapa e depois o inóculo foi transferido para tubo de ensaio contendo quatro mL de meio TBNR semi-sólido isento de nitrogênio (SELDIN *et al.*, 1984). A estirpe foi crescida por sete dias a 30 °C e, em seguida, foi observada a formação de película esbranquiçada no meio de cultura.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados da avaliação da germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas de repolho depois de três dias de plantio mostraram que não houve diferenças significativas quando as estirpes de *B. thuringiensis* foram comparadas em relação às

testemunhas (Tabela 1). As estirpes bacterianas não inibiram e nem estimularam a germinação (Kruskal-Wallis:  $H_5 = 3,4$ ;  $P = 0,639$ ), assim como o desenvolvimento das plântulas logo após a germinação (Kruskal-Wallis:  $H_5 = 9,954$ ;  $P = 0,077$ ).

Estes resultados foram semelhantes aos resultados apresentados por Assis *et al.* (1995) que mostraram que a inoculação com *Bacillus subtilis* não influenciou a germinação de sementes de rabanete (*Raphanus sativus*). Entretanto, outros trabalhos com *B. subtilis* indicaram aumento na germinação de sementes de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) (CAMPELLO, 1992). Isto demonstra que estirpes bacterianas podem ter efeitos diferenciados em função da planta e da bactéria utilizada, assim como, em função do tempo de exposição da semente ao tratamento. Estes efeitos podem ocorrer em função de mecanismos como fixação de nitrogênio, produção de fitohormônios, competição, controle de fitopatógenos entre outros, que estão envolvidos no processo regulatório do crescimento vegetal (SABINO *et al.*, 2000).

Tabela 1 – Efeito de estirpes de *Bacillus thuringiensis* sobre o percentual de germinação das sementes tratadas por 5 minutos e o desenvolvimento de plântulas de repolho pós-germinação (3 dias) (média  $\pm$  desvio padrão)

Tratamentos	Tamanho de Plântulas (cm)	% de germinação
Testemunha 1 (Água)	3,11 $\pm$ 1,079a	100 $\pm$ 0,000a
Testemunha 2 (Meio Embrapa)	3,69 $\pm$ 1,742a	100 $\pm$ 0,000a
S1905	4,69 $\pm$ 2,496a	94,44 $\pm$ 9,624a
S2122	4,56 $\pm$ 1,648a	94,44 $\pm$ 9,624a
S2124	3,67 $\pm$ 1,590a	100 $\pm$ 0,000a
S1450 – Btk	3,50 $\pm$ 1,620a	94,44 $\pm$ 9,624a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentaram diferenças significativas

Com relação ao desenvolvimento das plântulas após 30 dias, efeitos estimuladores e inibitórios puderam ser observados e variaram em função das estirpes e das testemunhas utilizadas (Tabela 2).

Após 30 dias de cultivo, o crescimento da parte aérea foi induzido positivamente pela estirpe de *B. thuringiensis* S1905 ( $\pm 27\%$ ), quando comparada com a estirpe padrão S1450 (ANOVA:  $F = 3,011$ ;  $P = 0,018$ ), mas quando comparada com as testemunhas, não apresentou diferença significativa. Com relação ao comprimento das raízes (Kruskal-Wallis:  $H_5 = 8,226$ ;  $P = 0,144$ ) e número de folhas (Kruskal-Wallis:  $H_5 = 6,326$ ;  $P = 0,276$ ), todos os tratamentos foram semelhantes entre si. Já em relação ao peso fresco (ANOVA:  $F = 14,616$ ;  $P < 0,001$ ) e seco (ANOVA:  $F = 6,821$ ;  $P < 0,002$ ), as estirpes bacterianas, em geral, apresentaram efeito negativo quando comparadas com as testemunhas.

Tabela 2 – Efeito de estirpes de *Bacillus thuringiensis* sobre o desenvolvimento de plântulas de repolho após 30 dias de cultivo *in vitro* (média  $\pm$  desvio padrão)

Tratamentos	Altura da Parte Aérea (cm)	Comprimento da Raiz (cm)	Peso da matéria fresca (g)	Peso da matéria seca (g)	Número de folhas (und)
Testemunha 1 (Água)	8,27 $\pm$ 1,041ab	9,88 $\pm$ 1,417a	0,500 $\pm$ 0,0636a	0,0277 $\pm$ 0,00300a	2,9 $\pm$ 0,316a
Testemunha 2 (Meio Embrapa)	8,08 $\pm$ 1,948ab	7,52 $\pm$ 2,004a	0,459 $\pm$ 0,0705a	0,0239 $\pm$ 0,00412ab	3,2 $\pm$ 0,000a
S1450 – Btk	7,05 $\pm$ 0,765b	8,89 $\pm$ 1,025a	0,305 $\pm$ 0,0795b	0,0195 $\pm$ 0,00596b	3,0 $\pm$ 0,000a
S1905	8,96 $\pm$ 1,526a	8,7 $\pm$ 1,274a	0,285 $\pm$ 0,0671b	0,0193 $\pm$ 0,00582b	3,0 $\pm$ 0,470a
S2122	7,4 $\pm$ 1,518ab	9,07 $\pm$ 3,375a	0,310 $\pm$ 0,112 b	0,0210 $\pm$ 0,00553b	3,1 $\pm$ 0,568a
S2124	8,75 $\pm$ 0,995ab	9,67 $\pm$ 5,147a	0,319 $\pm$ 0,0486b	0,0205 $\pm$ 0,00424b	2,7 $\pm$ 0,483a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentaram diferenças significativas

As estirpes de *B. thuringiensis* aqui estudadas não promoveram significativamente o crescimento das plântulas de repolho quando comparadas com a testemunha, nas condições testadas. Gomes *et al.* (2003) apresentaram resultados semelhantes para a produção orgânica de mudas de alface (*Lactuca sativa* L.) em campo, quando tratadas com *B. thuringiensis* subvariedade *kenyae* e *Bacillus pumilus* crescidos por 36 horas.

A estirpe S1905 foi selecionada para a continuidade do trabalho em função de seu potencial como agente de controle biológico de *Plutella xylostella* em campos de repolho (PRAÇA *et al.*, 2010), pela sua capacidade de colonizar plântulas de repolho cultivadas *in vitro* e induzir o desenvolvimento da parte aérea das plântulas quando comparada com o padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1.

Os resultados dos experimentos com o tempo de imersão das sementes nos diferentes tratamentos com a estirpe S1905 por 5 minutos mostraram que esta estirpe não apresentou efeito sobre a germinação das sementes (Kruskal-Wallis:  $H_5 = 4,809$ ;  $P = 0,569$ ) e nem sobre o desenvolvimento das plântulas de repolho quando comparados com a testemunha, logo após a germinação (ANOVA:  $F = 0,802$ ;  $P = 0,569$ ) (Tabela 3). Estes resultados foram semelhantes aos apresentados com tratamento de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com *B. subtilis* crescido por sete dias (ASSIS *et al.*, 1995).

Tabela 3 – Efeito dos diferentes tratamentos com a estirpe de *Bacillus thuringiensis* S1905 sobre o percentual de germinação das sementes e o desenvolvimento de plântulas de repolho pós-germinação (3 dias) tratadas por 5 minutos (média ± desvio padrão)

Tratamentos	Tamanho de Plântulas (cm)	% de germinação
Testemunha	5,16 ± 1,359a	86,67 ± 16,33a
S1905 24 h Bactéria total	5,37 ± 1,5756a	90,00 ± 10,95a
S1905 24 Sobrenadante	5,23 ± 1,666a	93,33 ± 10,33a
S1905 24 Sedimento	5,46 ± 1,519a	78,00 ± 22,80a
S1905 48 Bactéria total	5,43 ± 1,803a	86,67 ± 10,33a
S1905 48 Sobrenadante	5,91 ± 2,216a	90,00 ± 10,95a
S1905 48 Sedimento	5,88 ± 1,784a	96,67 ± 8,17a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentaram diferenças significativas

Pode ser observado na Tabela 4 que, quanto ao desenvolvimento das plântulas depois de 30 dias, efeitos inibitórios que variaram em função dos tratamentos utilizados para imersão das sementes por 5 minutos. Depois de 30 dias após a germinação, o crescimento da parte aérea (Kruskal-Wallis:  $H_6 = 6,786$ ;  $P = 0,341$ ), da raiz (ANOVA:  $F = 1,232$ ;  $P = 0,292$ ) e o peso da matéria fresca (Kruskal-Wallis:  $H_6 = 14,575$ ;  $P = 0,024$ ) das plântulas avaliadas não apresentaram diferenças significativas, e se mostraram semelhantes à testemunha. Quando os parâmetros peso seco (ANOVA:  $F = 2,944$ ;  $P = 0,009$ ) e peso fresco foram avaliados, o tratamento sobrenadante que foi crescido por 24 horas apresentou efeitos inibitórios, o que pode ter ocorrido em função da menor produção de AIA com 24 horas de crescimento bacteriano. O mesmo foi observado para o mesmo tratamento que quando comparado com a testemunha, apresentou efeito inibitório em relação à variável número de folhas (Kruskal-Wallis:  $H_6 = 23,709$ ;  $P \leq 0,001$ ).

Tabela 4 – Efeito dos diferentes tratamentos com a estirpe de *Bacillus thuringiensis* S1905 sobre desenvolvimento de plântulas de repolho após 30 dias do tratamento das sementes por 5 minutos (média  $\pm$  desvio padrão)

Tratamentos	Altura da Parte Aérea (cm)	Comprimento da Raiz (cm)	Peso da matéria fresca (g)	Peso da matéria seca (g)	Número de folhas (und)
Testemunha	4,39 $\pm$ 0,963a	10,45 $\pm$ 2,694a	0,519 $\pm$ 0,123a	0,0237 $\pm$ 0,00572a	3,39 $\pm$ 0,571a
S1905 24 h Bactéria total	4,68 $\pm$ 0,690a	9,57 $\pm$ 2,177a	0,443 $\pm$ 0,125a	0,0197 $\pm$ 0,00621ab	2,96 $\pm$ 0,624ab
S1905 24 Sobrenadante	4,00 $\pm$ 1,339a	10,30 $\pm$ 2,471a	0,404 $\pm$ 0,125b	0,0179 $\pm$ 0,00545b	2,60 $\pm$ 0,764b
S1905 24 Sedimento	4,07 $\pm$ 1,331a	9,47 $\pm$ 2,214a	0,452 $\pm$ 0,107a	0,0203 $\pm$ 0,00599ab	2,80 $\pm$ 0,577ab
S1905 48 h Bactéria total	4,20 $\pm$ 1,035a	10,31 $\pm$ 2,454a	0,469 $\pm$ 0,0859a	0,0221 $\pm$ 0,00554ab	3,15 $\pm$ 0,587ab
S1905 48 h Sobrenadante	4,53 $\pm$ 1,424a	9,11 $\pm$ 2,237a	0,487 $\pm$ 0,0137a	0,0229 $\pm$ 0,00620a	3,10 $\pm$ 0,539ab
S1905 48 h Sedimento	4,65 $\pm$ 1,293a	9,48 $\pm$ 1,830a	0,462 $\pm$ 0,0878a	0,0201 $\pm$ 0,00590ab	2,82 $\pm$ 0,772ab

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentaram diferenças significativas

Novos experimentos foram conduzidos com o tratamento das sementes nos diferentes tratamentos com a estirpe S1905 por 15 e 30 minutos (Tabelas 5 a 8), já que estirpes bacterianas podem ter efeitos diferenciados em função da planta e da bactéria utilizada, assim como, em função do tempo de exposição da semente ao tratamento, uma vez que a adesão de bactérias em plantas pode aumentar com o tempo e a concentração inicial do inóculo (REIS e OLIVARES, 2006).

Os resultados obtidos com as sementes imersas por 15 min na bactéria mostraram que todos os tratamentos com a estirpe Bt S1905 não influenciaram a germinação das sementes de repolho tratadas (Kruskal-Wallis:  $H_6 = 7,543$ ;  $P = 0,274$ ). Com relação ao desenvolvimento das plântulas de repolho três dias após a germinação, o sedimento com 48 horas da estirpe S1905 proporcionou um incremento no tamanho das plântulas de repolho em torno de 200% em relação à testemunha (Kruskal-Wallis:  $H_6 = 56,961$ ;  $P \leq 0,001$ ), mostrando um



crescimento inicial maior nas plântulas tratadas com a bactéria concentrada crescida por 48 horas. Dados semelhantes foram observados em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) em casa de vegetação microbiolizadas com bactérias pré-selecionadas para o biocontrole de mancha-parda (SANTOS *et al.*, 2001). Da mesma forma, outros trabalhos realizados com bacterização de sementes com outra espécie do gênero *Bacillus*, *B. amyloliquefasciens*, demonstraram a melhoria na qualidade de mudas de pepino (*Cucumis sativus*) (SILVEIRA *et al.*, 2004).

O resultado obtido com a imersão das sementes por 15 minutos está em conformidade com o resultado obtido por Reis e Olivares (2006) e Lopez-Bucio *et al.* (2007) com *B. megaterium*. Estes autores observaram que este microrganismo promoveu o crescimento e desenvolvimento de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Dos autores citados acima é importante observar que Bulied *et al.* (2002) e Lopes-Bucio *et al.* (2007) demonstraram o efeito destes microrganismos sobre o desenvolvimento de soja (*Glycine max* L.) e feijão, respectivamente, ou seja o efeito promotor de crescimento sobre dicotiledôneas, da mesma forma que neste trabalho com repolho.

Tabela 5 – Efeito dos diferentes tratamentos com a estirpe de *Bacillus thuringiensis* S1905 sobre o percentual de germinação e sobre o desenvolvimento de plântulas de repolho pós-germinação (3 dias) (Média ± desvio padrão) tratadas por 15 minutos

Tratamentos	Tamanho de Plântulas (cm)	% de germinação
Testemunha	13,47 ± 6,626bc	100,00 ± 0,000a
S1905 24 h Bactéria total	17,99 ± 9,593bc	90,00 ± 9,131a
S1905 24 h Sobrenadante	20,00 ± 11,921bc	90,00 ± 14,906a
S1905 24 h Sedimento	10,75 ± 4,807c	76,67 ± 7,455a
S1905 48 h Bactéria total	23,43 ± 15,321b	96,67 ± 7,455a
S1905 48 h Sobrenadante	24,29 ± 14,346ab	96,67 ± 7,455a
S1905 48 h Sedimento	41,56 ± 19,268a	100 ± 0,000a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentaram diferenças significativas

Com relação ao desenvolvimento das plântulas depois de 30 dias, efeitos promotores do crescimento das plântulas de repolho foram observados em alguns tratamentos de imersão das sementes por 15 min na estirpe S1905 crescida por 48 horas e de inibição em alguns tratamentos da bactéria S1905 com 24 horas. O tratamento que apresentou maior incremento da parte aérea foi o sedimento da estirpe S1905 com 48 horas (Kruskal-Wallis:  $H_6 = 56,676$ ;  $P \leq 0,001$ ) (Tabela 6). Fato similar também foi constatado quando raízes de plantas de alface foram tratadas com *B. subtilis* (AP-3) na concentração de  $1 \times 10^4$  células por mL por 30 min (CÔRREA e BETTIOL, 2009). Entretanto, o fato relatado acima foi para tratamento de raízes, diferente deste trabalho onde as sementes foram tratadas. De acordo com Boehme *et al.* (2005) o tratamento das raízes em concentrado bacteriano se mostra mais eficiente, então futuramente, novos trabalhos com o tratamento das raízes poderão ser realizados.

Os tratamentos sedimento e sobrenadante com 24 horas quando comparados com a bactéria total com 48 horas e a com a testemunha apresentaram efeitos negativos com relação

à variável raiz (Kruskal-Wallis:  $H_6 = 41,560$ ;  $P \leq 0,001$ ). O sobrenadante com 24 horas inibiu o desenvolvimento das plântulas com relação ao parâmetro peso fresco quando comparado com todos os outros tratamentos, com exceção do tratamento sedimento com 24 horas (Kruskal-Wallis:  $H_6 = 41,563$ ;  $P \leq 0,001$ ). A inibição pode ter ocorrido em função da menor produção de AIA com 24 horas de crescimento bacteriano, o que foi observado também no tratamento com 5 minutos de imersão das sementes no sobrenadante com 24 horas.

O sobrenadante com 48 horas apresentou um maior incremento do peso seco quando comparado com a testemunha e com o sobrenadante com 24 horas (Kruskal-Wallis:  $H_6 = 41,242$ ;  $P \leq 0,001$ ). Resultados similares foram observados em mudas de pepino (*Cucumis sativus* L.) bacterizadas com os isolados PEP81 (*Bacillus amyloliquefaciens* Priest) e PEP91 (*Enterobacter cloacae* Hormaeche 23 and Edwards) aumentos de, respectivamente, 33,3 e 27,5% para matéria seca total (SILVEIRA *et al.*, 2001).

Com relação ao número de folhas, todos os tratamentos se mostraram semelhantes à testemunha com exceção do sobrenadante da estirpe S1905 com 24 horas que apresentou um efeito inibitório (Kruskal-Wallis:  $H_6 = 37,154$ ;  $P \leq 0,001$ ).

Isso pode ser explicado pelo fato de que bactérias endofíticas podem estimular o crescimento de plantas em um estágio de desenvolvimento e inibir em outro (STURZ e NOWAK, 2000).

Tabela 6 – Efeito dos diferentes tratamentos com a estirpe de Bt S1905 sobre o desenvolvimento de plântulas de repolho (média ± desvio padrão) após 30 dias do tratamento das sementes por 15 minutos

Tratamentos	Altura da Parte Aérea (cm)	Comprimento da Raiz (cm)	Peso da matéria fresca (g)	Peso da matéria seca (g)	Número de folhas (und)
Testemunha	7,7 ± 1,287bcd	14,02 ± 2,188a	0,555 ± 0,105a	0,0264 ± 0,00569bc	3,24 ± 0,435a
S1905 24 h Bactéria total	8,0 ± 1,778bc	12,93 ± 3,252a	0,633 ± 0,157a	0,0307 ± 0,00699ac	3,51 ± 0,6924a
S1905 24 h Sobrenadante	5,7 ± 2,319d	8,96 ± 4,974b	0,300 ± 0,234b	0,0192 ± 0,00940b	2,30 ± 0,993b
S1905 24 h Sedimento	6,3 ± 2,361bd	9,29 ± 4,853b	0,484 ± 0,232ab	0,0273 ± 0,0109ac	3,32 ± 0,673a
S1905 48 h Bactéria total	8,7 ± 1,294ac	13,60 ± 3,637a	0,574 ± 0,123a	0,0282 ± 0,00671ac	3,31 ± 0,541a
S1905 48 h Sobrenadante	8,3 ± 2,221ac	14,11 ± 3,817a	0,638 ± 0,160a	0,0333 ± 0,00741a	3,43 ± 0,679a
S1905 48 h Sedimento	9,3 ± 1,224a	14,09 ± 3,261a	0,576 ± 0,0737a	0,0282 ± 0,00471ac	3,30 ± 0,466a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentaram diferenças significativas

Os resultados dos experimentos com 30 min de imersão das sementes na bactéria com o sobrenadante filtrado e não filtrado, o sedimento e a bactéria total com 48 horas mostraram que os tratamentos com a estirpe Bt S1905 não influenciaram a germinação das sementes de repolho tratadas (Kruskal-Wallis:  $H_4 = 7,158$ ;  $P = 0,128$ ) e o desenvolvimento das plântulas após três dias (Kruskal-Wallis:  $H_4 = 9,160$ ;  $P = 0,057$ ) (Tabela 7).

Tabela 7 – Efeito dos diferentes tratamentos com a estirpe de *B. thuringiensis* S1905 sobre o desenvolvimento de plântulas de repolho pós-germinação (3 dias) (Média ± desvio padrão) tratadas por 30 minutos

Tratamento	Tamanho de Plântulas (cm)	% de germinação
Testemunha	19,25 ± 5,799a	100 ± 0,00a
S1905 48 h Bactéria total	18,48 ± 5,362a	93,33 ± 9,13a
S1905 48 Sobrenadante	21,15 ± 6,555a	96,67 ± 7,46a
S1905 48 Sobrenadante Filtrado	18,40 ± 4,246a	100 ± 0,00a
S1905 48 Sedimento	22,45 ± 7,744a	90,00 ± 9,13a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentaram diferenças significativas

Com relação ao desenvolvimento das plântulas de repolho depois de 30 dias, os parâmetros altura da parte aérea (Kruskal-Wallis:  $H_4 = 2,367$ ;  $P = 0,669$ ), peso fresco (Kruskal-Wallis:  $H_4 = 2,792$ ;  $P = 0,593$ ), peso seco (Kruskal-Wallis:  $H_4 = 1,824$ ;  $P = 0,768$ ) e número de folhas (Kruskal-Wallis:  $H_4 = 4,532$ ;  $P = 0,339$ ) foram analisados e observou-se que não houve diferenças significativas entre estes e a testemunha (Tabela 8).

Com relação ao comprimento das raízes, os resultados mostraram que os tratamentos, sobrenadante filtrado e bactéria total, inibiram o desenvolvimento das raízes quando comparados com a testemunha (ANOVA:  $F = 4,154$ ;  $P = 0,003$ ) (Tabela 8). Portanto o tratamento com 48 horas por 30 minutos deve ser evitado, uma vez que um bom desenvolvimento de raízes é essencial para a implantação de uma cultura e melhor adaptação a condições de seca e para uma maior absorção de nutrientes.

Tabela 8 – Efeito dos diferentes tratamentos com a estirpe de *B. thuringiensis* S1905 sobre desenvolvimento de plântulas de repolho (média ± desvio padrão) após 30 dias do tratamento das sementes por 30 minutos. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não apresentaram diferenças significativas

Tratamentos	Altura da Parte	Comprimento	Peso da matéria	Peso da matéria	Número de
	Aérea	da Raiz	fresca	seca	
	(cm)	(cm)	(g)	(g)	(und)
Testemunha	9,72 ± 1,593a	17,96 ± 3,933a	0,732 ± 0,178a	0,0476 ± 0,0123a	5,3 ± 0,79a
S1905 48 h Sobrenadante	9,70 ± 2,260a	16,41 ± 4,793ab	0,725 ± 0,207a	0,0672 ± 0,104a	5,2 ± 0,88a
S1905 48 h Sobrenadante Filtrado	9,24 ± 2,147a	14,84 ± 4,709b	0,746 ± 0,236a	0,0507 ± 0,0159a	5,2 ± 0,74a
S1905 48 h Bactéria total	10,62 ± 3,595a	13,64 ± 3,88b	0,748 ± 0,182a	0,0454 ± 0,0106a	5,1 ± 0,56 <sup>a</sup>
S1905 48 h Sedimento	9,99 ± 2,559a	16,46 ± 4,051ab	0,795 ± 0,215a	0,0496 ± 0,0135a	5,3 ± 1,19 <sup>a</sup>

Após a avaliação do desenvolvimento das plântulas, bioensaios seletivos foram realizados utilizando-se os frascos com as plântulas originárias das sementes tratadas por 30 minutos colonizadas por *B. thuringiensis*. Todos os tratamentos proporcionaram 100% de mortalidade de lagartas de *P. xylostella*, com exceção das plântulas provenientes do tratamento testemunha e do sobrenadante filtrado que não foram efetivos contra *P. xylostella* (Tabela 9).

Tabela 9 – Mortalidade de lagartas de *P. xylostella* em plântulas tratadas com diferentes tratamentos com a estirpe de *B. thuringiensis* S1905

Tratamentos	% de mortalidade
Testemunha	0
S1905 48 h Bactéria total	100
S1905 48 h Sobrenadante	100
S1905 48 h Sobrenadante Filtrado	0
S1905 48 h Sedimento	100

Os mecanismos de ação da estirpe S1905 foram avaliados e os resultados mostraram que a estirpe S1905 apresentou uma produção de AIA menor que 1µg/mL no meio Embrapa, de 9,92 µg/mL no meio King B e de 20,61 µg/mL no meio DYGS (Tabela 10). A produção de AIA apresentou resultados diferentes entre os meios, demonstrando que a produção de AIA pode ser influenciada pelos estágios e condições de crescimento e pelo substrato avaliado (MIRZA *et al.*, 2001). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com diferentes estirpes de *Bacillus* sp. (BENEDUZI *et al.*, 2009).

Tabela 10 - Produção de AIA pela estirpe de *B. thuringiensis* S1905 em diferentes meios de cultura

Meios de Cultura	Produção de AIA (µg/mL)
Embrapa	< 1
DYGS	20,61
King B	9,92

Entretanto, esta estirpe apresentou resultados negativos para a produção de sideróforos e solubilização de fosfato, mas apresentou película esbranquiçada e espessa em meio para fixação biológica de nitrogênio, o que demonstra que juntamente com a produção de AIA que a fixação pode ser um dos mecanismos de promoção de crescimento desta estirpe.

Alguns microrganismos podem apresentar mais de um mecanismo de promoção do crescimento vegetal, como o observado para algumas bactérias do gênero *Bacillus* como *B. megaterium*, *B. pumillus* e *B. cereus* que podem produzir ácido giberélico, AIA, e zeatina, que em concentrações adequadas podem promover o crescimento de plantas (BULLIED *et al.*, 2002; JOO *et al.*, 2005; KANG *et al.*, 2006; KARADENIZ *et al.*, 2006).

Pode-se observar que o melhor tratamento foi à imersão das sementes no sedimento da estirpe S1905 por 15 min, demonstrando um incremento significativo no crescimento das plântulas em torno de 200% e na altura da parte aérea de 12 % (Tabela 5 e 6). A produção de AIA pode ter influenciado o desenvolvimento inicial das plântulas de repolho, já que este fitohormônio pode atuar sobre o desenvolvimento da parte aérea de plantas (SILVA e BETTIOL, 2009). Os resultados de efetividade das plântulas colonizadas por *B. thuringiensis* no controle de *P. xylostella* e os resultados de promoção abrem perspectivas para a utilização sistêmica de *B. thuringiensis* para a promoção do crescimento de plantas e para o controle de *P. xylostella*.

A capacidade de promover o crescimento vegetal agrega vantagens na utilização de esta bactéria como microrganismo multifuncional, pois além da estirpe S1905 ser efetiva no controle biológico de pragas (PRAÇA *et al.*, 2010), poderá ser utilizada para melhorar a produção e qualidade de plântulas de repolho, diminuindo a dependência dos métodos químicos, permitindo a redução de custos de produção e melhoria na fertilidade do solo.

Após a seleção desta estirpe, é importante que novos experimentos sejam conduzidos para avaliar a forma mais adequada de aplicação desta bactéria como inoculante microbiano e



de forma que suas estruturas penetrem e estabeleçam nos tecidos vegetais. Métodos práticos e confiáveis devem ser estudados.

Apesar dos estudos apresentados serem *in vitro*, os resultados foram promissores. No entanto, há que se considerar a avaliação destes tratamentos em casa de vegetação e no campo para que se possa afirmar seu potencial de uso em lavouras comerciais nas condições de solo e clima do Brasil, além de ser uma alternativa mais segura ao ambiente e à saúde humana para o desenvolvimento sustentável.

#### **4 CONCLUSÕES**

Com relação ao efeito de *B. thuringiensis* sobre o crescimento das plântulas de repolho, o sedimento da estirpe S1905 apresentou um efeito positivo sobre o crescimento inicial e sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de repolho cultivadas *in vitro*.

Desta forma, este trabalho apresentou uma excelente contribuição para o futuro da utilização sistêmica de *B. thuringiensis* para o controle de insetos-praga e para a promoção do crescimento vegetal.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ASGHAR, H. N.; ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M.; KHALID, A. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth promoting activities in *Brassica jucea* L. **Biology and Fertility of Soil**, v. 35, p. 231-237, 2002.

ASSIS, S. M. P.; MARIANO, R. I. R.; REIS, A.; SILVEIRA, E. B.; MICHEREFF, S. J. Ação de rizobactérias no crescimento de rabanete e no controle biológico na podridão negra e da antracnose. **Arquivos de biologia e tecnologia**, v. 38, p. 843-850, 1995.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant-growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 11, p. 557-574. 2001.

BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L. K.; ZANETTINI, M. H.; PASSAGLIA, L. Evaluation of genetic diversity and PGPR activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 39, p. 311-320, 2008.

BOEHME, M.; SCHEVTSCHENKO, J.; PINKER, I. Effect of bioestimulators on growth of vegetables in hidroponical systems. **Acta Horticulturae**, v. 697, p. 337-344. 2005.

BULLIED, W. J.; BUSS, T. J.; VESSEY, J. K. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation and N accumulation in grain legumes: field studies. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 82, n. 2, p. 291-298, 2002.

CAMPELLO, F. B. B. **Controle biológico de *Cylindrocladium scoparium* Morgan, agente causal do tombamento de mudas de *Eucalyptus* spp., com bactérias antagonistas.** (Dissertação de Mestrado). Recife. Universidade Federal Rural Pernambuco. 1992. 84 p.

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

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 669-678. 2010.

CORRÊA, E. B.; BETTIOL, W. Controle da Podridão de raiz e promoção de crescimento em hidroponia com bactérias. In. BETTIOL, W. E.; MORNDI, M. A. B. **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas.** 2009. p. 225-237.

DAVITT, A. J.; CHEN, C.; RUDGERS, J. A. Understanding context-dependency in plant–microbe symbiosis: The influence of abiotic and biotic contexts on host fitness and the rate of symbiont transmission. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 137-145. 2011.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 1995. 66p.

DONG, Z.; HEYDRICH, M.; BERNARD, K.; MCCULLY, M. E. Further evidence that the N<sub>2</sub>-fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1843-1846, 1995.

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, 2003.

HARDOIM, P.R., OVERBEEK, L.S. VAN; ELSAS, J.D. VAN. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 463-471. 2008.

JOO, G. J. et al. Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of red peppers. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 43, n. 6, p. 510-515, 2005.

KANG, B. R.; YANG, K. Y.; CHO, B. H.; HAN, T. H.; KIM, I. S. Production of indole-3-acetic acid in the plant-beneficial strain *Pseudomonas chlororaphis* O6 is negatively regulated by the global sensor kinase GacS. **Current Microbiology**, New York, v. 52, n. 6, p. 473-476, 2006.

KARADENIZ, A.; TOPCUOGLU, S. F.; INAN, S. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 22, n. 10, p. 1061-1064, 2006.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, New York, v. 44, p. 301-307, 1954.

KUO, J., FOX, E., MACDONALD, S. **Sigmastat: statistical software for working scientists**. Users manual. Jandel Scientific, San Francisco, CA, 1992.

LÓPEZ-BUCIO, J.; CAMPOS-CUEVAS, J. C.; HERNÁNDEZ-CALDERÓN, E.; VELÁSQUEZ-BECERRA, C.; FARIÁS-RODRÍGUEZ, R.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L. I.; VALENCIA-CANTERO, E. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin-and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, n. 2, p. 207-217. 2007.

MEDEIROS, P. T.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G.; SOUZA, N. R. **Instalação e manutenção de criação massal da traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*)**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 4p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular técnica, 29).

MIRZA, M. S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAIRUT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K. A. Isolation, partial characterization and the effect of plant growth promotion bacteria (PGPB) on micropropagated sugar cane *in vitro*. *Plant Soil*, v. 237, p. 47-54. 2001.

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 gemmatilis*. **Biological Control**, v. 41, p. 291-295, 2007.

MURASKIGE, T.; SKOOG, F. K. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 2003, 40p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161).

PRACA, L. B.; RAMOS, F. R.; RAMOS, F. R.; WAGNER, F. O.; SOARES, C. M. S.; SUJII, E.; MONNERAT, R.G. Suscetibilidade da traça-das-crucíferas a *Bacillus thuringiensis* em repolho no Distrito Federal. **Universitas**. Ciências da Saúde (UNICEUB. Impresso), Brasília, v. 8, p. 17-31, 2010.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L. **Vias de Penetração e Infecção de Plantas por Bactérias**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 34 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 216).

SABINO, D. C. C.; FERREIRA, J. S.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Avaliação da capacidade das bactérias *Burkholderia brasiliensis* e *Herbaspirillum seropidicae* em promover o crescimento de plântulas de arroz**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 3p. (Embrapa Agrobiologia, Comunicado Técnico, 45).

SANTOS, A. S.; MOURA, A. B.; SILVEIRA, A. O. Promoção de crescimento de plantas de arroz induzida por bactérias pré-selecionadas para o biocontrole da mancha-parda. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26 (Supl.), p. 300. 2001 (Resumo).

SARWAR, M.; KREMER, R.J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters Applied Microbiology**, v. 20, p. 282-285, 1995.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Annals of Biochemistry**, v. 160, p. 47-56, 1987.

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.

SILVA, H. S. A; BETTIOL, W. Microrganismos endofíticos como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro e de promoção de crescimento. In. BETTIOL, W. E MORNDI, M. A. B. **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**. 2009. p. 277-288.

SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A; MARIANO, R.L.R.; SILVA NETO, E.B. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.217-221, 2004.

SILVEIRA, E. B; SOUZA, J. R. B. S.; MARIANO, R. L. R. Efeito de bactérias na promoção de crescimento de plantas de pepino. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, suplemento, p. 302, 2001.

STURZ, A. V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam v. 15, p. 183-190, 2000.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 12, p. 15-22, 1982.